

0718834-1

УДК 579.852.11 : 577.152.3

На правах рукописи

ШАРИПОВА Маргарита Рашидовна

**ГИДРОЛАЗЫ *Bacillus intermedius*:
ВЫДЕЛЕНИЕ, СВОЙСТВА, ЛОКАЛИЗАЦИЯ**

03.00.07 - микробиология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Казань- 2000

Работа выполнена в Казанском государственном университете

Научный консультант: доктор биологических наук,
профессор И.Б.Лещинская

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор М.А.Несмеянова

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник Г.И.Эль-Регистан

доктор ветеринарных наук,
профессор Р.Г.Госманов

Ведущее учреждение: Институт биохимии и биофизики КНЦ РАН,
г.Казань

Защита состоится 30 ноября 2000 г. в 1430 часов на заседании
диссертационного Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени
доктора биологических наук ДР 053.29.39 в Казанском государственном
университете
по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, 18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного
университета

Автореферат разослан "27" октября 2000 г.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000731825

Ученый секретарь

диссертационного Совета, к. б. н.

Аскарова А.Н.



Актуальность проблемы. Многие белки микроорганизмов для своего функционирования должны транслоцироваться из цитоплазмы, где они синтезируются, в специфические компартменты клетки или за ее пределы. Основные компартменты прокариотических микроорганизмов - это компартменты клеточной оболочки. У грамположительных организмов - это цитоплазматическая мембрана и клеточная стенка, у грамотрицательных организмов, кроме того, периплазма и наружная мембрана. В процессе транслокации белков в эти компартменты, т. е. в процессе секреции, они проходят все стадии своего биогенеза, превращаясь из неактивных предшественников в активные макромолекулы. Многие белки секретируются в среду и, именно секретируемые белки, локализованные в компартментах клеточной оболочки или выделяемые непосредственно в среду, определяют различные типы взаимодействия клетки с окружающим миром и представляют значительный интерес с точки зрения механизмов управления метаболизмом.

Секреция белков в среду особенно широко распространена среди представителей грамположительных бактерий из рода *Bacillus*, имеющих менее сложную, чем у грамотрицательных организмов, клеточную оболочку. Бациллы выделяют разнообразные ферменты, способные катализировать расщепление различных высокополимерных соединений: белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, а также других органических веществ.

К настоящему времени достигнуты значительные успехи в познании молекулярных основ секреции. Установлено, что информация о секреции белка заключена в его первичной структуре, специфических топогенных последовательностях полипептидной цепи белка. N-концевой сигнальный пептид предшественников секретируемых белков, имеющий общие черты строения для всех секретируемых белков, необходим для узнавания этих белков аппаратом секреции и их транслокации через цитоплазматическую мембрану. Показано, что первичная структура зрелой части молекулы также влияет на эффективность секреции. Так, замены аминокислот в N-концевом участке зрелой полипептидной цепи щелочной фосфатазы *Escherichia coli* влияли на эффективность процессинга,

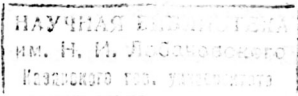
секреции и изоферментный спектр щелочной фосфатазы (Nesmeyanova *et al.*, 1994; Карамышев с соавт., 1994). Изучение биогенеза протеиназ бацилл показало, что последовательности их ДНК включают участки протяженностью 70-200 остатков, кодирующие полипептиды, способные сохранять белок в неактивной форме во время транслокации и катализировать образование активного фермента на этапе его освобождения в среду (Pugsley, 1993). Процесс секреции катализируется сложным белковым аппаратом, включающим как цитоплазматические, так и мембранные белки. К настоящему времени наиболее полно охарактеризована секреторная система *E. coli*. Уровень знаний о белковой секреции у бацилл существенно ниже. Более того, при достаточной универсальности транслокации через цитоплазматическую мембрану, пути секреции в среду у грамотрицательных бактерий и бацилл различны в силу разной организации их клеточной оболочки. При этом данные о секреции белков у бацилл, известные к началу настоящей работы, были ограничены расшифровкой деталей молекулярного механизма секреции на примере одного модельного белка. Представляло интерес систематизировать эти знания при изучении клеточного топогенеза ряда секретируемых белков, отличающихся по физико-химическим и каталитическим свойствам, а также структурной организации, у одного вида этих бактерий.

Целью работы явилось установление особенностей локализации и секреции ферментов, относящихся к разным классам гидролаз у бактерий *Bacillus intermedius* во взаимосвязи с физиологическими функциями этих ферментов.

В соответствии с целью работы были определены следующие экспериментальные задачи:

1. Отбор штаммов *B. intermedius* с высоким уровнем секреции фосфатазы и протеиназы и изучение условий, необходимых для оптимального синтеза и секреции этих ферментов.

2. Выделение и характеристика гидролитических ферментов: фосфатазы и протеиназы *B. intermedius*.



3. Изучение локализации гидролаз: РНКазы, фосфатазы и протеиназы в клеточных фракциях при разных условиях культивирования бактерий.

4. Получение мутантных РНКаз с заменами аминокислот, участвующих в формировании элементов вторичной структуры молекулы белка, и изучение их секреции.

5. Изучение полиаденилирования мРНК у бактерий *B. intermedius* и взаимосвязь этого процесса с образованием секретируемых гидролаз.

6. Изучение синтеза внеклеточных гидролаз и спорообразования у *B. intermedius*.

Научная новизна. Впервые проведено широкое систематическое изучение клеточного топогенеза белков, относящихся к разным классам гидролаз, у одного вида бацилл, включая мутантные рибонуклеазы с заменами аминокислот, участвующих в формировании вторичной структуры молекулы. Использование ферментов, различных по физико-химическим характеристикам и структурной организации, позволило выявить разную эффективность секреции этих белков в среду. Установлено участие ионов металлов (Co^{2+} и Ca^{2+}) в освобождении в среду фосфатазы и протеиназы. Освобождение РНКазы зависит от скорости формирования элементов вторичной структуры в молекуле белка. Субтилизиноподобная тиолзависимая протеиназа и щелочная фосфатаза *B. intermedius* выделены из культуральной жидкости и охарактеризованы. Получены приоритетные данные о том, что часть мРНК, которая направляет синтез внеклеточных гидролаз, полиаденилирована.

В результате проведенных исследований на защиту выносятся следующие **научные положения:**

1. Бактерии *B. intermedius* во время постэкспоненциального роста секретируют в окружающую среду различные ферменты, обладающие гидролитической функцией. Уровень их секреции определяется факторами среды и фазой роста микроорганизмов.
2. Изученные гидролазы различаются по физико-химическим и каталитическим свойствам. Рибонуклеаза (12.3 кДа) содержит большое количество

гидрофобных аминокислот, что в отсутствии остатков цистеина обеспечивает высокую устойчивость фермента в широком диапазоне pH и температуры. Протеиназа (32.5 кДа) характеризуется повышенным содержанием остатков Asx и Glx и имеет 1-3 остатка полуцистина на молекулу, что обеспечивает относительно стабильную конформацию. Фосфатаза (46 кДа), в молекуле которой отсутствуют свободные SH- группы или S-S связи, отличается лабильностью.

3. Изучаемые гидролитические ферменты, существенно различающиеся по физико-химическим свойствам, имеют разную локализацию и распределение между субклеточными фракциями и культуральной жидкостью. Эффективность секреции этих белков коррелирует с физико-химическими характеристиками ферментов, включая особенности структурной организации.
4. Изучаемые гидролазы относятся к ферментам катаболического обмена, расщепляющим экзогенные субстраты. Образование внеклеточных форм этих ферментов, включая ферменты, локализованные в компартментах клеточной оболочки, корегулируются одинаковыми факторами.
5. Обнаружены гидролазы, секретируемые бактериями на разных стадиях спорообразования, при этом выявлена регуляторная взаимосвязь между синтезом тиолзависимой протеиназы и спорогенезом. Стабилизация мРНК путем полиаденилирования может представлять один из механизмов обеспечения высокого уровня синтеза и секреции ферментов в фазе замедления роста культуры.

Теоретическая и практическая значимость. Установленная закономерность между эффективностью освобождения ферментов в среду и их физико-химическими характеристиками является вкладом в формирование общего представления о механизмах секреции белков у бацилл. Полученные данные позволяют лучше понять отдельные этапы в секреции белков во взаимосвязи с их структурными особенностями и биосинтезом, и, в частности, механизмы освобождения белков в среду, которые отличаются у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Эти данные полезны при разработке стратегии

сбалансированного вывода белков из клеток бактерий для биотехнологических целей. В работе созданы основы для получения внеклеточных гидролаз в количестве, необходимом для практического использования. Установлено, что РНКаза обладает ингибиторной активностью в отношении бактериофагов и фитопатогенных вирусов. Сведения о тиолзависимой сериновой протеиназе и фосфатазе *B. intermedius* пополняют знания о белках соответствующих классов и полезны для уточнения их классификации, расширяют арсенал инструментов для научных исследований в молекулярной биологии и геной инженерии, поскольку субтилизиноподобные тиолзависимые протеиназы более стабильны, чем обычные субтилизины, а щелочная фосфатаза обладает двумя каталитическими функциями: ФМЭ и ФДЭ активностями. Данные о субстратной специфичности тиолзависимой протеиназы представляют особый интерес для прогнозирования участков множественного процессинга внеклеточных белков, в котором участвует этот фермент.

Связь работы с базовыми научными программами. Исследования по теме работы проведены в период с 1983 по 2000 г. в соответствии с программой НИР Казанского государственного университета. Работа являлась составной частью межотраслевой программы “Нуклеазы” в течение 1983-1990 гг., поддержана грантом “Ферменты микроорганизмов” в рамках программы “Университеты России - фундаментальные исследования” (1992-1999) и грантами Академии Наук Республики Татарстан (1998, 1999 гг.).

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на XV конгрессе FEBS (Брюссель, 1983), симпозиуме FEMS “Регуляция микробного метаболизма факторами внешней среды” (Пушино, 1983), IV симпозиуме по медицинской энзимологии (Алма-Ата, 1983), VII Всесоюзном съезде микробиологов (Алма-Ата, 1985), V Всесоюзном биохимическом съезде (Киев, 1986), конференции “Регуляция микробного метаболизма” (Пушино, 1989), конференции “Методы получения, анализа и применения ферментов” (Юрмала, 1990), конференции “Получение и идентификация микробных метаболитов” (Пушино, 1991), III симпозиуме “Химия протеолитических ферментов” (Москва, 1993), конференции

по биосинтезу ферментов микроорганизмами (Москва, 1993), 2 конгрессе по биотехнологии (Брайтон, 1994), 16 конгрессе по биохимии и молекулярной биологии (Нью-Дели, 1994), 4 Всемирном конгрессе по биотехнологии (Мельбурн, 1995), Евро-Азиатском симпозиуме по проблемам биотехнологии (Анкара, 1995), конференции, посвященной 100-летию Бейеринка (Гаага, 1995), VII конференции по промышленному применению ферментов (Барселона, 1997), конгрессах по рибонуклеазам (Москва, 1988; Капри, 1993; Вирджиния, 1999), 30 симпозиуме "Protein-99" (Бостон, 1999), Европейских форумах по биотехнологии (Флоренция, 1993; Ница, 1995; Будапешт, 1997; Брюссель, 1999), конференциях по нуклеазам микроорганизмов (Рига, 1985, 1989; Казань, 1989, 1991, 1998).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 65 печатных работ, из которых 31 статья в отечественных и зарубежных изданиях, включая 4 обзорные статьи, 31 тезисов докладов на Международных и Всероссийских конференциях и конгрессах, 3 патента на изобретение.

Место выполнения работы. Основные экспериментальные данные получены автором за время работы в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов при кафедре микробиологии Казанского университета в период с 1983 по 2000 г. Данные по субстратной специфичности, аминокислотному составу, N-концевой последовательности тиолзависимой протеиназы получены совместно с аспирантом к.б.н. Е.Л.Ицкович на кафедре химии природных соединений Химического факультета МГУ под руководством профессора Г.Н.Руденской. Работа по выделению и очистке РНКазы и внутриклеточного белка, обладающего ингибиторной активностью по отношению к РНКазе, выполнена автором в экспериментальной лаборатории на заводе медицинских препаратов г. Рига (Латвия) при участии ст. химика Т.И.Волковой под руководством зав. лабораторией Г.И.Клейнера и зав. лабораторией С.В.Лопатнева. Эксперименты с полиаденилированной РНК проведены совместно с аспирантом к.б.н. Е.Р.Ромахиной. Получение мутантных РНКаз выполнено совместно с аспирантом к.б.н. Л.В.Лопуховым в лаборатории генной инженерии под руководством д.б.н. В.Н.Ксёзенко (ИБФМ, Пущино). Работа по выделению и характеристике

фосфатазы проведена совместно с аспирантом к.б.н. Н.В.Нехотяевой. Противовирусная активность РНКазы определена автором в лаборатории вирусологии университета г. Лейпцига (Германия) под руководством профессора Э.Штенца и профессора З.Клюге.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка литературы (342 ссылки, из которых 299 на зарубежные издания). Работа изложена на 222 страницах, содержит 25 таблиц и 34 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись: *Bacillus intermedius* 7P - природный продуцент внеклеточной РНКазы (Лещинская с соавт., 1978), антибиотикоустойчивые штаммы *B. intermedius* взяты из коллекции культур КГУ, штаммы *E. coli* SURE и XLI Blue использованы как штаммы-реципиенты для плазмид с генами мутантных РНКаз.

Для выделения ферментов использовали ионообменную хроматографию на фосфо-, ДЭАЭ- и КМ-целлюлозах и колонке MonoS в режиме FPLC "Pharmacia" (Швеция). Молекулярную массу определяли гель-проникающей хроматографией на колонке Superose 12 HR 10/30 фирмы "Pharmacia". Степень чистоты препаратов и молекулярную массу определяли электрофорезом в 12.5% ПААГ в присутствии SDS-Na (Laemmli, 1970).

Протеолитическую активность определяли по гидролизу казеина (Каверзнева, 1971). Активность тиолзависимой протеиназы и глутамилэндопептидазы определяли по расщеплению хромогенных пептидных субстратов Z-Ala-Ala-Leu-pNA и Z-Glu-pNA (Люблинская с соавт., 1984). Фосфомоноэстеразную и фосфодиэстеразную активности определяли по действию фермента на p-нитрофенилфосфат (p-NPP) и бис-p-нитрофенилфосфат (bis-NPP) (Serva, Германия) соответственно (Лещинская с соавт., 1980). Активность РНКазы определяли по продуктам гидролиза РНК, растворимым в 4% HClO₄ с 12%

уриилацетатом (Лещинская *с соавт.*, 1980). Для определения ингибиторной активности по отношению к РНКазе использовали препарат гомогенной внеклеточной РНКазы. Энзимограммы РНКаз и фосфатаз получали как описано в работах (Wolf, 1968) и (Sinha and Singh, 1980), соответственно.

Для определения аминокислотного состава протеиназу гидролизovali и анализировали на аминокислотном анализаторе Hitachi 835 (Япония). Для определения N-концевой последовательности аминокислот протеиназу иммобилизовали на мембране Immobilon P и секвенировали на секвенаторе Knauer-816 (Applied Biosystems 120 A PИH, Analyzer one Line, США).

Протопласты получали после инкубации клеток с лизоцимом в 10 мМ Трис-НCl-буфере, pH 8.5, содержащем 1 мМ ЭДТА, 10 мМ MgCl₂, 20% сахарозу, в течение 30-40 мин при 37°. Протопласты отделяли центрифугированием и разрушали холодным осмотическим шоком, нуклеиновые кислоты осаждали стрептомицин сульфатом. Активность ферментов определяли в культуральной жидкости, во фракции клеточной стенки, полученной после удаления протопластов центрифугированием, во фракции цитоплазмы, полученной после лизиса протопластов и осаждения нуклеиновых кислот. Для получения препаратов мембран после лизиса протопластов к смеси добавляли ДНКазу (1 мг/мл) (Serva, Германия), инкубировали 30 мин при 30° и центрифугировали при 30000 g в течение 1 час.

Суммарную РНК получали из лизатов протопластов осаждением LiCl (4.5 М). Поли(А)⁺РНК получали аффинной хроматографией сРНК на поли(У)-сефарозе (Берман *с соавт.*, 1978). Биологическую активность поли(А)⁺РНК определяли в искусственной системе трансляции ооцитов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Gurdon *et al.*, 1971). Растворимую фракцию гомогенатов ооцитов после трансляции в них бактериальной РНК подвергали разделению электрофорезом в 12.5% ПААГ с SDS-Na (Laemmli, 1970).

Кроличью антисыворотку к РНКазе получали по стандартной схеме и чистили на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой по методу (Зильбер, 1968). Иммуноферментный анализ гомогенатов ооцитов проводили в твердо-фазной системе прямым методом

(Умнова *с соавт.*, 1986). Имобилизацию пероксидазы на кроличьих антителах к бактериальной РНКазе проводили как описано в работе (Янкина, Ванеева, 1985). Иммуноэлектрофорез и ракетный иммунофорез проводили в 1% агарозном геле как описано в работе (Гааль *с соавт.*, 1982; Вееке, 1977). Вестерн-блоттинг проводили с помощью электрофоретического переноса белков из геля на нитроцеллюлозу с последующей идентификацией РНКазы с использованием набора реактивов PhotoBlot (Promega, США) и кроличьих антител в РНКазе (Burnette, 1981).

Для введения мутаций в ген РНКазы использовали олигонуклеотид-направленный мутагенез (Ho *et al*, 1989). Применяли плазмиду pML5, несущую исходный ген РНКазы, любезно предоставленную доктором Е. Червокальской для работы. Конструкции с генами мутантных РНКаз получены клонированием PCR-фрагментов в вектор BlueScript KS+. Наличие мутаций в гене подтверждали секвенированием ДНК (Sanger *et al.*, 1977). Выделение плазмиды и трансформацию *E. coli* плазмидами проводили стандартными методами (Маниатис *с соавт.*, 1982).

Математическую обработку результатов проводили в программной среде Microsoft Excel путем расчета среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma \leq 15\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

I. Выделение и характеристика внеклеточных гидролаз *B. intermedius*

При работе с нативным штаммом попытки выделения внеклеточных фосфатазы и протеиназы были неудачны из-за низкой концентрации белков в культуральной жидкости. Возникла необходимость поиска штаммов с уровнем секреции, достаточным для выделения и характеристики ферментов. Более высокая активность ферментов обнаружена у штаммов, устойчивых к стрептомицину: выход ферментов у них увеличивался более чем в 3 раза. В культуральной жидкости этих штаммов наблюдались два пика фосфатазной активности, соответствующих разным фазам роста: фазе замедления и стационарной фазе. Поскольку активность фосфатазы в фазе замедления роста

была выше, проводили выделение и изучение этого фермента. Была получена среда для выращивания бактерий с максимальным выходом фосфатазы, содержащая Co^{2+} (0.1 мМ), 5'-АМФ (20 мкг/мл) и пируват натрия (0.5%). Удельная скорость синтеза фермента возрастала и достигала максимальной величины в фазе замедления роста, когда удельная скорость роста культуры снижалась.

Для эффективной продукции протеиназы необходимо высокое содержание Фн, недостаток которого в пептоне компенсируется его введением в среду культивирования (0.2 г/л). Синтез фермента подавляется легко метаболизируемыми источниками углерода, в том числе глюкозой, и комплексом аминокислот, но активируется в присутствии казеина и желатина (Ицкович *с соавт.*, 1995). Удельная скорость синтеза фермента в культуральной жидкости нарастала в начале стационарной фазы при минимальной удельной скорости роста. Таким образом, фосфатаза и протеиназа относятся к ферментам катаболического обмена.

Для получения фосфатазы использовали хроматографию фермента на колонке MonoS в системе FPLC. Результаты очистки представлены в табл. 1. По данным электрофореза в 12.5% ПААГ в присутствии SDS-Na препарат фосфатазы не содержал примесных белков. Молекулярная масса составила 47 кДа. С помощью гель-проникающей хроматографии на колонке Superose 12 HR в отсутствие детергентов показано, что молекулярная масса фермента составляет 46 ± 2 кДа. Субстратный блоттинг показал присутствие одной полосы. Фермент активен в форме мономера и обладает фосфодиэстеразной активностью (ФДЭ), которая составляет $45 \pm 1.9\%$ от активности фосфомоноэстеразы (ФМЭ).

Таблица 1. Очистка внеклеточной щелочной фосфатазы *B. intermedius*

Стадии очистки	Объем, мл	Общий белок, мг	Удельная активность, ед/мг	Степень очистки
Культуральная жидкость	900	18700	0.0008	1
ДЭАЭ-целлюлоза	50	2350	0.002	2.5
SP-Сефароза	16	1.6	0.8	1000
Колонка Mono S HR 5/5	2.5	0.125	1.71	2140

Оптимальные pH и температура для ФМЭ и ФДЭ активности совпадают и равны pH 9.5 и 55°. Фермент стабилен в интервале pH 8.0-10. Более 50% активности теряется за час инкубации при pH 7.0. 60% активности ФМЭ и ФДЭ сохраняется при инкубации при 55° в течение 15 мин. Активность фермента утрачивается после инкубации при 60° за 30 мин. Стабильность фермента возрастает в среднем на 30% в присутствии ионов Mg^{2+} . Изучение субстратной специфичности фосфатазы показало, что фермент способен отщеплять фосфорный остаток от различных субстратов (табл. 2), отдавая предпочтение нуклеозидмонофосфатам. Величина K_m для субстрата *p*-NPP составила 1.2 мМ.

Таблица 2. Субстратная специфичность внеклеточной фосфатазы

Субстрат	Активность, %	Субстрат	Активность, %
<i>p</i> -NPP	100**	5'-ЦМФ	100**
bis-NPP	45**	АДФ	56**
5'-АМФ	100**	ГДФ	52**
3'-АМФ	72**	УДФ	51**
5'-ГМФ	100**	ГТФ	30**
3'-ГМФ	81**	АТФ	38**
5'-УМФ	100**	Фруктозо-1,6-дифосфат	60*
3'-УМФ	39**	Глюкоза-1-фосфат	50*

* – $\sigma \leq 10\%$, ** – $\sigma \leq 5\%$; активность выражена в % по отношению к активности на *p*-NPP

Обе активности увеличивались в присутствии Co^{2+} , Ca^{2+} и Mg^{2+} с максимальным эффектом в отношении Co^{2+} при концентрации 0.1 мМ (в 2 раза по сравнению с контролем). Повышение концентрации металлов приводит к подавлению активности фосфатазы. Ионы Cu^{2+} , Fe^{2+} и Mn^{2+} оказывают ингибирующее действие (40-60%) на обе активности. Данные по влиянию ингибиторов на ФМЭ и ФДЭ активность фосфатазы представлены на рис. 1. ЭДТА ингибирует обе активности. Реагенты на тиоловые группы не влияют на активность фермента.

Таким образом, фосфатаза активна в форме мономера и активируется ионами двухвалентных металлов. По результатам ингибиторного анализа в структуре

молекулы не содержит свободных SH-групп или дисульфидных связей. Особенностью выделенного белка по сравнению с другими фосфатазами бацилл является присутствие ФДЭ активности, что делает его близким фосфатазе PhoD *B. subtilis* (46 кДа) (Eder *et al.*, 1996).

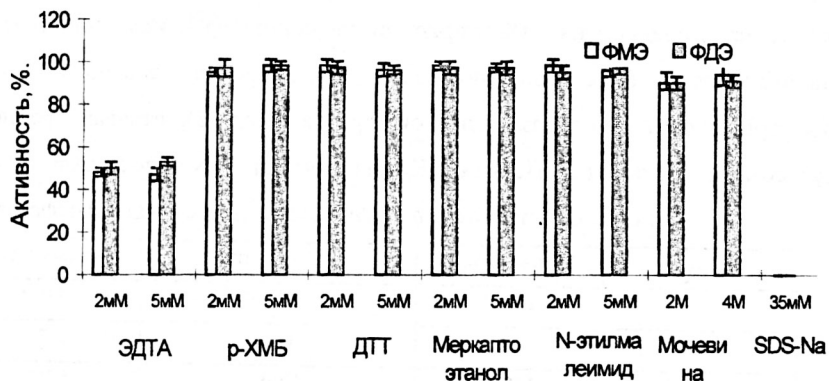


Рис. 1. Влияние ингибиторов на ФМЭ и ФДЭ активность внеклеточной щелочной фосфатазы *B. intermedius*. 100% - активность фермента в отсутствии реагентов.

Очистку внеклеточной протеиназы проводили с помощью ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и колонке MonoS (табл. 3).

Таблица 3. Очистка внеклеточной протеиназы *B. intermedius*.

Стадия очистки	V, мл	Общий белок A ₂₈₀	Субстрат Z-Ala-Ala-Leu-pNa		
			Удельная активность, ед/A ₂₈₀	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость	2000	35800	0.016	1	100
Хроматография на КМ-целлюлозе	72	79.2	3.3	205	45
Рехроматография на КМ-целлюлозе	11	38.5	5.2	325	34
Хроматография на колонке MonoS	8	11.2	8.88	600	20

Получили три белковых пика (рис. 2). Протеиназа первого пика гидролизует Glp-Ala-Ala-Leu-pNA (субстрат для субтилизинов), протеиназа второго пика гидролизует Z-Glu-pNA (субстрат для глутамилэндопептидаз), протеиназа третьего пика гидролизует субстраты для субтилизинов Z-Ala-Ala-Leu-pNA и Glp-Ala-Ala-Leu-pNA, но в отличие от обычных субтилизинов чувствительна к

реагентам на тиоловые группы. Последующие эксперименты выполнены с протеиназой 3-го пика, на которую приходится около 75% в пуле внеклеточных протеиназ. Электрофорез белка в 12.5% ПААГ с SDS-Na показал наличие одной полосы, которая соответствовала белку с молекулярной массой 32.5 кДа. Величина K_m для субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNA составила 1.25 мМ, $k_{cat}=0.15 \text{ сек}^{-1}$.

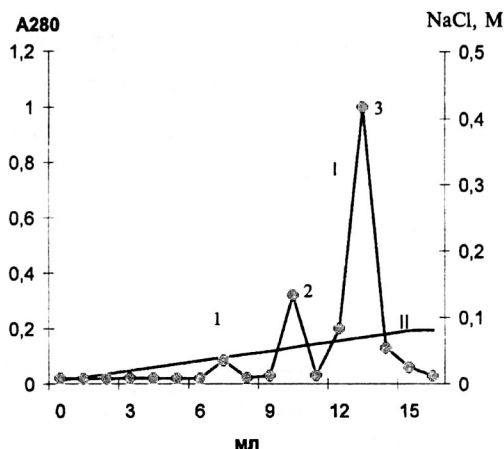


Рис. 2. Хроматография внеклеточных протеиназ *B. intermedius* на колонке MonoS. I - A₂₈₀; II - градиент NaCl (0-0.5M) в 15 мМ Na-ацетатном буфере, pH 6.3, содержащем 0.5 мМ CaCl₂. 1 - протеиназа, гидролизующая субстрат Glp-Ala-Ala-Leu-pNA. 2 - протеиназа, гидролизующая субстрат Z-Glu-pNA. 3 - протеиназа, гидролизующая субстрат Z-Ala-Ala-Leu-pNA

Протеиназа стабильна в интервале pH 6.3-11.0. При снижении pH активность резко уменьшается, при pH 5.5 белок необратимо инактивируется. При гидролизе казеина оптимальный pH 10. Оптимальной температурой является 50°. Фермент стабилен при инкубации при 55° в течение 30 мин; с увеличением температуры происходит резкое снижение активности (до 10% от исходной). Фермент хранится при -18° несколько недель без потери активности, и выдерживает процедуру замораживания-оттаивания. Присутствие ионов Ca²⁺ стабилизирует белок: при 18° активность фермента повышается на 20%, а при 45° - в 3 раза после инкубации в 0.05 М Трис-HCl-буфере, pH 8.0, содержащем 5 мМ CaCl₂. Ионы Zn²⁺, Co²⁺ и Mg²⁺ в конечной концентрации 0.1-1 мМ не влияют на активность фермента.

Протеиназа эффективно гидролизует гемоглобин, фибрин, овальбумин, казеин и альбумин из человеческой сыворотки (табл. 4). Фермент не гидролизует специфические субстраты химотрипсина, глутамилэндопептидазы и тиоловых протеиназ. Максимальную активность протеиназа проявляет по отношению к субстратам субтилизина Glp-Ala-Ala-Leu-pNA и Z-Ala-Ala-Leu-pNA, эффективно гидролизует трипептиды с С-концевым лейцином или фенилаланином, причем отдает предпочтение лейцину. Фермент не гидролизует специфические субстраты химотрипсина, глутамилэндопептидазы и тиоловых протеиназ. Гидролиз В-цепи инсулина протеиназой приводит к появлению многочисленных пептидных фрагментов, что подтверждает широкую субстратную специфичность фермента. Отличительной чертой является то, что в В-цепи инсулина протеиназа не гидролизует связи, образованные карбоксильной группой дикарбоновой аминокислоты Glu.

Таблица 4. Активность тиолзависимой протеиназы на различных субстратах

Субстрат	Удельная активность, ед/мг белка	Субстрат	Удельная активность, ед/мг белка
Казеин, 2%	93.0	Glp-Ala-Ala-Leu-pNA	21.7
Азоказеин, 0.5%	7.61	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	8.8
Фибрин, 0.3%	67.6	Z-Gly-Ala-Phe-pNA	3.59
Денатурированный бычий гемоглобин, 2%	112.9	Z-Gly-Ala-Leu-pNA	3.34
Овальбумин, 1%	97	Z-Ala-Gly-Leu-pNA	1.53
Сывороточный человеческий альбумин, 1%	40	Z-Ala-Ala-Phe-pNA	0.53
Glp-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA	0	Z-Gly-Gly-Leu-pNa	0.49
Boc-Phe-Pro-Glu-Ile-pNA	0	Z-Ala-Ala-Ala-pNA	0.2
Glp-Phe-pNA	0	Z-Ala-Ala-Gly-pNA	0.04
Glp-Phe-Ala-pNA	0		

Активность фермента полностью подавляется специфическими ингибиторами сериновых протеиназ (DFP и PMSF) и устойчива к действию хелатирующих агентов (ЭДТА и о-фенантролина). Протеиназа ингибируется реагентами на тиоловые группы — п-ХМБ и солями ртути. Мочевина (2-8М) не влияет на активность белка, а SDS-Na в конечной концентрации 1% полностью

инактивирует белок. Эти данные позволяют классифицировать фермент как субтилизиноподобную тиолзависимую сериновую протеиназу.

Определение аминокислотного состава протеиназы показало, что фермент характеризуется повышенным содержанием остатков Asx и Glx и содержит 1-3 остатка полуцистина на молекулу, один из которых, возможно, цистеин. При определении N-концевой последовательности аминокислот протеиназы показано, что на протяжении 15 остатков фермент обнаруживает 80% совпадений с субтилизином Карлсберг и с субтилизином BPN'. Аминокислоты, идентичные с N-концевыми остатками тиолзависимых протеиназ, составляют не более 30 %.

Итак, *B. intermedius* выделяют в среду гидролазы, различающиеся по физико-химическим свойствам и условиям выхода из клеток. Ферменты использованы как модельные белки для изучения особенностей их локализации и секреции.

II. Изучение локализации и секреции гидролаз *B. intermedius*

2.1. Секреция РНКазы. На рис. 3 представлены данные по определению активности РНКазы в культуральной жидкости, клеточной стенке, мембране и цитоплазме в разных условиях культивирования бактерий: на средах с Фн и без него, при замене источника углерода в составе среды, а также в присутствии Ca^{2+} (5 мМ). 99% активного фермента обнаружено в культуральной жидкости.

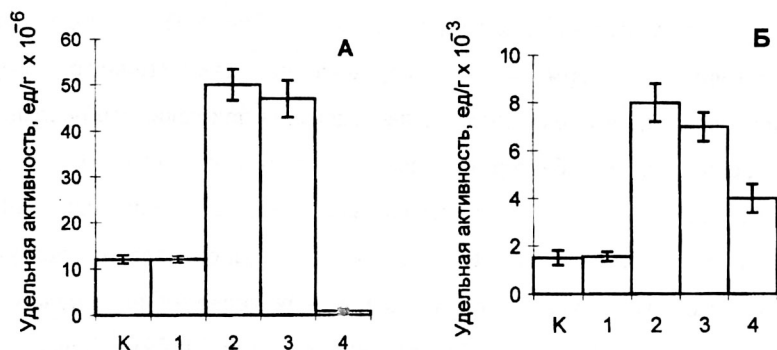


Рис. 3. Удельная активность РНКазы (ед/г биомассы) в культуральной жидкости (А) и клеточной стенке (Б) *B. intermedius*, выращенных на средах с добавлением: 1 - CaCl_2 (5 мМ), 2 - глюкозы (1%), 3 - лактата (1%) и 4 - Na_2HPO_4 (0.01%). К - исходная среда.

В клетках РНКазная активность обнаружена в количестве меньше 1% от общей активности РНКазы. Фермент локализован в клеточной стенке. Активность РНКазы в цитоплазме была низкой - 300 ед/г биомассы (внеклеточная - 50×10^6 ед/г клеток) и не менялась в различных условиях культивирования.

Энзимограммы показали присутствие в лизатах нескольких фракций РНКаз. Установлено, что с клеточной поверхностью ассоциированы две формы фермента с R_f 0.72 и 0.96, синтез обоих регулируется экзогенным Фн, причем эффект сильнее выражен в отношении РНКазы с R_f 0.96. В цитоплазме спектр РНКаз более разнообразен (R_f 0.10, 0.17, 0.33, 0.45, 0.72, 0.82, 0.96) и остается неизменным при выращивании бактерий на среде с Фн, меняется только соотношение активности фракций. Среди них РНКазы с R_f 0.96 и R_f 0.72 составляют 3%.

Иммуноэлектрофорез с антителами против РНКазы показал присутствие двух белков, идентичных РНКазе, только во фракции клеточной стенки *B. intermedius*. Методом ракетного иммуноэлектрофореза установлено, что их содержание в поверхностном слое клеток составляет $20 \pm 1\%$ мкг белка/г сухой биомассы. Антисыворотка полностью ингибирует РНКазу с R_f 0.96 и частично РНКазы с R_f 0.72 и 0.82, элюированные из соответствующих фракций после проведения электрофореза в неденатурирующих условиях. Эти РНКазы могут являться промежуточными формами в образовании внеклеточного фермента. Иммунологические и биохимические исследования показали, что основная часть РНКазы, синтезируемой бактериями, освобождается в среду (>99%).

Структурно-функциональные исследования РНКазы показали, что белок содержит три остатка триптофана, которые в разной степени погружены в белковую глобулу и участвуют в формировании гидрофобного ядра молекулы (Голубенко *с соавт.*, 1981, 1982; Гришина *с соавт.*, 1989). Изучали влияние нарушений в структуре РНКазы на локализацию и секрецию фермента. Плазмиды, несущие гены нативной и мутантных РНКаз с заменами 34 и 70 остатков триптофана на аспарагин, были трансформированы в клетки *E. coli* и изучена секреция ферментов. При анализе методом Вестерн-блоттинга (рис. 4) показано,

что нативный фермент в виде двух изоформ (предшественник и зрелая форма) находится в культуральной жидкости (дорожки 1 и 2) и лизатах сферопластов (дорожка 5) *E. coli*. В культуральной жидкости *B. intermedius* присутствует одна форма фермента (дорожка 8). Эти данные свидетельствуют, что процессинг белка отличается у грамотрицательных и грамположительных бактерий и в формировании внеклеточной РНКазы у рекомбинантных штаммов *E. coli*, по-видимому, участвуют другие протеолитические ферменты.

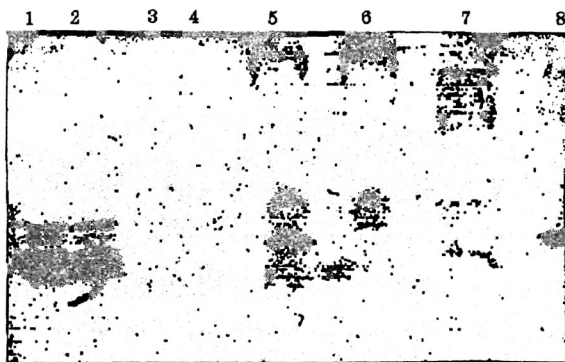


Рис. 4. Иммуноблоттинг с антителами к внеклеточной РНКазе *B. intermedius* образцов культуральной жидкости и клеточных фракций рекомбинантных штаммов *E. coli*: 1, 2 - культуральная жидкость *E. coli*, несущих исходный ген РНКазы; 3, 4 - культуральная жидкость *E. coli*, несущих мутантные гены РНКазы с заменами Trp34Asn и Trp70Asn, соответственно; 5 - лизат клеток *E. coli*, несущих исходный ген РНКазы; 6 - лизат клеток *E. coli*, несущих ген Trp34Asn-РНКазы; 7 - лизат клеток *E. coli*, несущих ген Trp70Asn-РНКазы; 8 - гомогенная внеклеточная РНКазы.

В культуральной жидкости *E. coli*, несущих гены мутантных РНКаз, фермент не обнаружен (дорожки 3 и 4). Иммуноблоттинг показал присутствие в лизатах сферопластов *E. coli*, несущих ген РНКазы с заменой Trp34Asn, одной изоформы белка, соответствующей по расположению полосы предшественнику фермента (дорожка 6). Белок не идентифицирован в цитоплазме и периплазме этих бактерий. Присутствие Trp34Asn-РНКазы в лизатах сферопластов, его отсутствие во фракциях периплазмы и цитоплазмы, свидетельствует, что фермент ассоциирован с мембраной. Отсутствие Trp34Asn-РНКазы в периплазме и

культуральной жидкости *E. coli* является следствием блокирования секреции модифицированного белка. РНКазы с заменой Trp70Asp в культуральной жидкости и лизатах *E. coli* не обнаружена. Ее отсутствие может указывать на невозможность взаимодействия модифицированного белка с мембраной для последующей транслокации и, как следствие, протеолиз фермента. Таким образом, направленные изменения в конформации приводят к нарушению секреции РНКазы.

2.2. Секреция щелочной фосфатазы. Солюбилизация фосфатазы с протопластов растворами солей и детергентов позволила обнаружить высокое содержание фермента в мембране *B. intermedius*. Максимальный выход фосфатазы происходит в присутствии $MgCl_2$ и $CaCl_2$ (30-100 ед/г). Солюбилизованный фермент отличается более высокой стабильностью по сравнению с внеклеточным. Активность фосфатазы обнаружена в цитоплазме, мембране, клеточной стенке. Изучали влияние условий культивирования на локализацию фосфатазы (рис. 5). На исходной среде мембраносвязанный фермент составляет 67%. Введение в состав среды $CoCl_2$ приводит к увеличению активности внеклеточного фермента и снижению уровня активности мембраносвязанного фермента в 2 раза, не влияя на общий уровень активности фосфатазы. Добавление в среду лактата в низких концентрациях (0.3%) приводит к увеличению активности внеклеточного (в 4 раза) и мембраносвязанного (в 1.5 раза) фермента. Относительное содержание внеклеточной фосфатазы возрастает от 30 до 58%. На среде, содержащей 3% лактата, относительное содержание мембраносвязанной фосфатазы возрастает до 72%. Мембраносвязанный фермент, видимо, участвует в периферической утилизации фосфатсодержащих соединений. Максимальная величина удельной активности фермента в мембране остается приблизительно на одном уровне. Введение Фн в среду приводит к репрессии синтеза внеклеточного и мембраносвязанного фермента, не влияя на активность фосфатазы в цитоплазме.

В стационарной фазе распределение фосфатазы было иным, чем в фазе замедления роста. Основное количество фермента (до 65%) освобождается в культуральную жидкость, в клетках фосфатаза преимущественно обнаружена в

клеточной стенке (до 25%). Удельная активность мембраносвязанного фермента остается практически неизменной во всех вариантах. Удельная активность фосфатазы в цитоплазме составляет 10 ед/г и не зависит от условий выращивания и фазы роста. Синтез фосфатазы, секретируемой бактериями в стационарной фазе, регулируется другими факторами, чем синтез фосфатазы в фазе замедления роста.

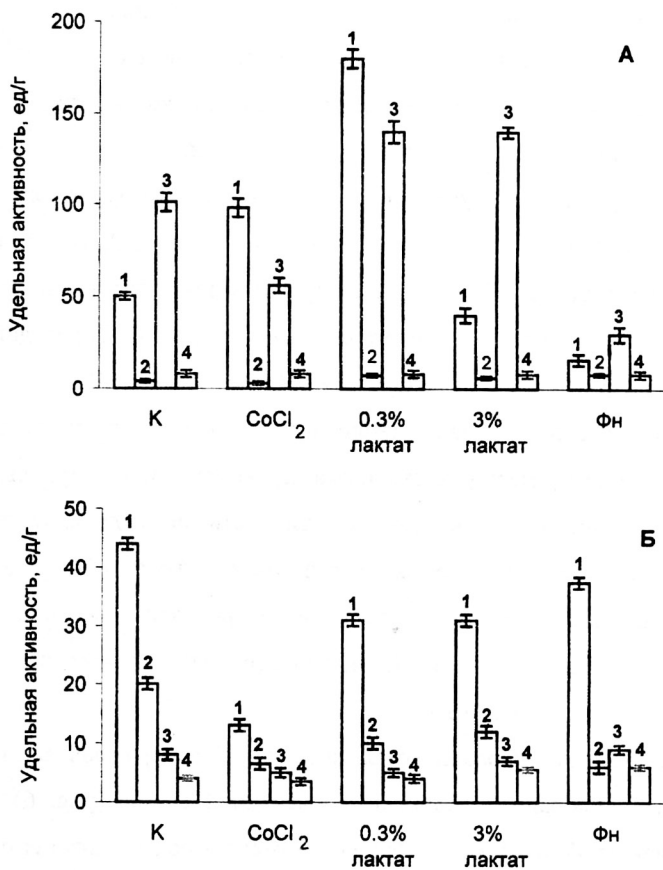


Рис. 5. Удельная активность фосфатазы (ед/г биомассы) в культуральной жидкости (1), клеточной стенке (2), мембране (3) и цитоплазме *B. intermedius*, выращенных на средах с добавками. К - исходная среда. А - фаза замедления роста, Б - стационарная фаза роста.

Энзимограммы фосфатазы показали, что в фазе замедления роста бактерий в цитоплазме обнаружены шесть форм фермента, в клеточной стенке и мембране - две формы фосфатазы с Rf 0.1 и 0.87. В стационарной фазе в клеточной стенке и

мембране обнаружена третья фосфатаза с R_f 0.5, в цитоплазме - 5 форм фермента, при этом увеличивается доля белков с высокой электрофоретической подвижностью. Различия в спектре множественных молекулярных форм могут отражать этапы в образовании зрелых форм фосфатазы.

2.3. Секреция протеиназы. Изучение локализации протеиназы *B. intermedius* проводили в стационарной фазе роста в условиях, когда активность внеклеточного фермента максимальна (среды с желатином и Фн), а также при низкой активности протеиназы в среде (среда с глюкозой и лактатом). Активность пула протеиназ оценивали по гидролизу казеина. Содержание тиолзависимой протеиназы в общем пуле протеиназ в клеточных фракциях определяли по гидролизу специфического субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNA. Показано, что фермент сольбилизирует с мембраны после обработки протопластов и интактных клеток *B. intermedius* растворами неорганических солей (1-3 М) и детергентов (1%). Экстракция максимальна в присутствии $MgCl_2$, $CaCl_2$ (2 М).

Изучено распределение протеолитической активности (субстраты: казеин и Z-Ala-Ala-Leu-pNA) между клеточными фракциями и культуральной жидкостью (рис. 6). Основная часть 86-98% активности по гидролизу двух субстратов обнаружена в культуральной жидкости. Фн и желатин в 3-4 раза увеличивали, а глюкоза и лактат в 2-4 раза ингибировали протеолитическую активность. $CaCl_2$ вызывал повышение удельной активности (ед/г клеток) по гидролизу двух субстратов в среднем на 18%.

В клетках казеинолитическая активность обнаружена во всех клеточных фракциях: мембране, цитоплазме и клеточной стенке (рис. 6). Активность по расщеплению Z-Ala-Ala-Leu-pNA обнаружена в сольбилизатах с мембраны, она максимальна на средах с Фн и желатином, а на средах с лактатом и глюкозой, в условиях репрессии синтеза внеклеточных ферментов, снижалась в 4 раза (рис. 6). Введение в среду $CaCl_2$ (5 мМ) приводило к снижению активности за счет освобождения фермента в среду. Показано, что изменение внеклеточной активности коррелирует с изменением протеолитической активности в сольбилизатах. В клеточной стенке тиолзависимая протеиназа обнаружена в

максимально индуцированных клетках (на средах с Фн и желатином). Казеинолитическая активность в клеточной стенке присутствует во всех условиях выращивания, что свидетельствует о наличии в клетке других протеиназ. В цитоплазме активность по гидролизу Z-Ala-Ala-Leu-pNA не обнаружена.

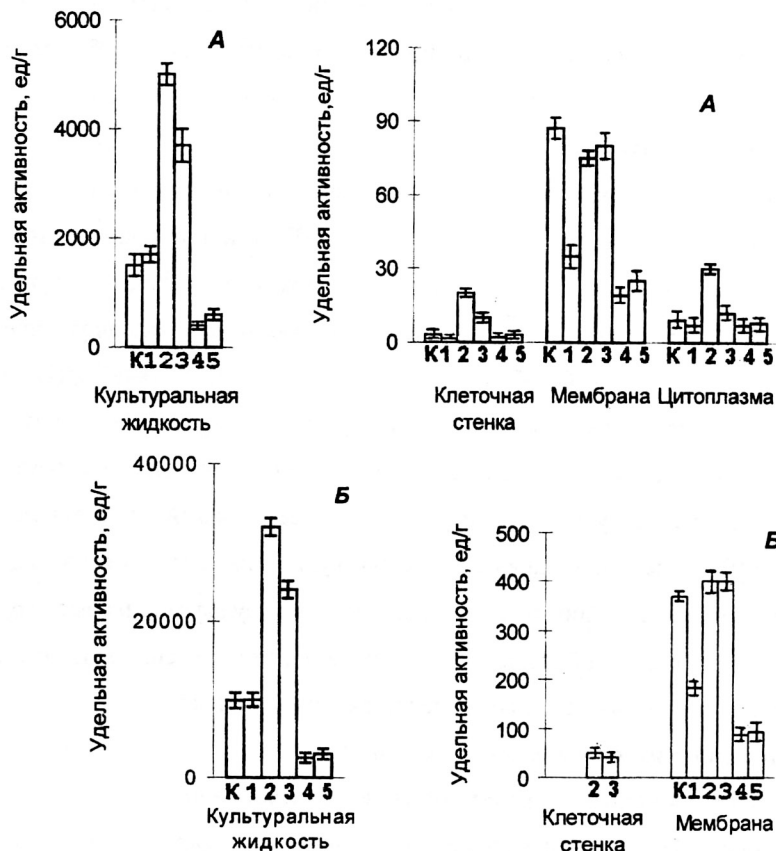


Рис. 6. Удельная активность (ед/г клеток) по казеину (А) и Z-Ala-Ala-Leu-pNA (Б) в культуральной жидкости и клеточных фракциях *B. intermedius* 3-19, выращенных на средах с добавлением: 1 - CaCl_2 (5 мМ), 2 - Na_2HPO_4 (0.02%), 3 - желатина (1%), 4 - глюкозы (1%), 5 - лактата (2%). К - исходная среда.

При варьировании условий выращивания происходит изменение в распределении ферментов. Доля внеклеточных ферментов возрастает на средах с Фн и желатином, на средах с глюкозой и лактатом возрастает доля ферментов,

локализованных в мембране. В условиях индукции протеиназы максимальный уровень активности составляет: по казеину - 80-90 ед/г, по Z-Ala-Ala-Leu-pNA - 370-400 ед/г. По-видимому, число дискретных сайтов для транслокации белка через мембрану ограничено. На основании данных по удельной активности гомогенных протеиназ, формирующих внеклеточный пул *B. intermedius*, можно заключить, что тиолзависимая протеиназа составляет около 40% от пула мембраносвязанных протеиназ, более 50% в мембране приходится на глутамилэндопептидазу.

В клеточной стенке казеинолитическая активность снижается в присутствии PMSF и ингибиторов нейтральных протеиназ (ЭДТА и о-фенантролина). По-видимому, в составе пула протеолитических ферментов наряду с сериновой протеиназой присутствует металлопротеаза. В мембране казеинолитическая активность ингибируется PMSF и не изменяется в присутствии ЭДТА и о-фенантролина, что указывает на присутствие сериновых протеиназ. Ингибирующее действие реагентов на тиоловые группы при гидролизе Z-Ala-Ala-Leu-pNA свидетельствует о присутствии тиолзависимой протеиназы. В цитоплазме PMSF не влияет на казеинолитическую активность, которую ЭДТА и о-фенантролин нацело ингибируют, реагенты на сульфгидрильные группы ингибируют на 80%. Ингибиторный анализ показал, что протеиназы цитоплазмы отличаются от мембраносвязанных и внеклеточных ферментов.

III. Изучение физиологической роли гидролаз

3.1. Синтез гидролаз и спорообразование у *B. intermedius*

Фосфатаза. Изучали изменение активности фосфатазы и динамику спорообразования в различных условиях роста *B. intermedius* 3-19 (рис. 7). Показано, что споры под микроскопом появляются после 24 часов, а после 35 часов роста клетки образуют споры (около 40% клеток). Первый пик фосфатазы соответствует фазе замедления роста и по времени опережает стадию инициации споруляции. Второй пик фосфатазы, уровень активности которого в 3 раза ниже первого, обнаружен между II и III стадиями спорообразования. Синтез фосфатазы второго пика не регулируется факторами, которые влияют на синтез фермента в

фазе замедления роста. Различное изменение активности фосфатаз в ответ на изменение условий выращивания позволяет предположить, что соответствующие ферменты отличаются по регуляции и физиологической функции.

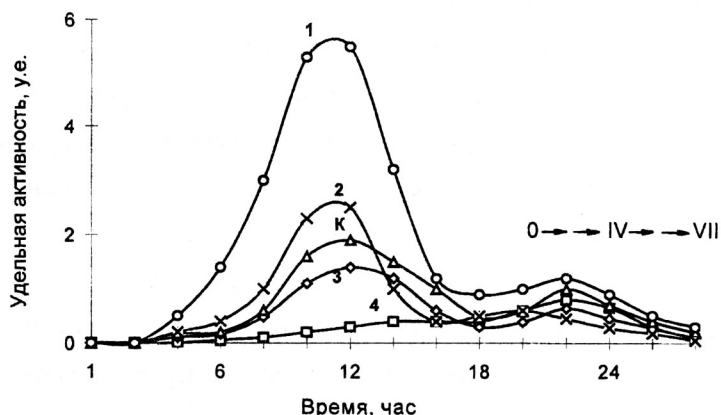


Рис. 7. Удельная активность внеклеточной фосфатазы *B. intermedius* на средах с добавлением: 1 - 0.3% лактата, 2 - 0.1 mM CoCl_2 , 3 - 3% лактата, 4 - 0.01% Na_2HPO_4 . 0 - VII - стадии спорообразования. $\sigma < 12\%$.

РНКаза. Уровень активности внеклеточной РНКазы существенно возрастает (в среднем в 4 раза) на среде с глюкозой (1%), которая ингибирует спорообразование (рис. 8).

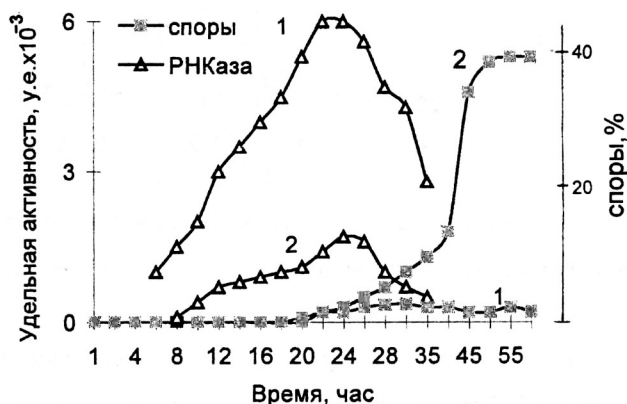


Рис. 8. Удельная активность внеклеточной РНКазы и динамика спорообразования *B. intermedius* на средах с добавлением 1% глюкозы (1) и без глюкозы (2). $\sigma < 12\%$. 100% - общее количество вегетативных и спорующих клеток.

На среде, не содержащей глюкозу, когда условия благоприятны для споруляции, уровень синтеза внеклеточного фермента низкий. Споры накапливаются в среде после 28 час роста. По-видимому, оба процесса разобщены и подчиняются разным системам контроля.

Протеиназа. Результаты по динамике спорообразования и изменению казеинолитической активности в различных условиях роста *B. intermedius* представлены на рис. 8. Обнаружены два пика казеинолитической активности: на 24-й и 49-й час роста. Установлено, что синтез тиолзависимой протеиназы (субстрат - Z-Ala-Ala-Leu-pNA) происходит на 24 час роста и совпадает с первым пиком казеинолитической активности, а также со стадией инициации спорообразования (стадия 0). Активность второго пика соответствовала VII стадии спорообразования и превышала активность первого в среднем в 6 раз. Глюкоза (1%) ингибирует споруляцию и образование внеклеточных протеиназ.

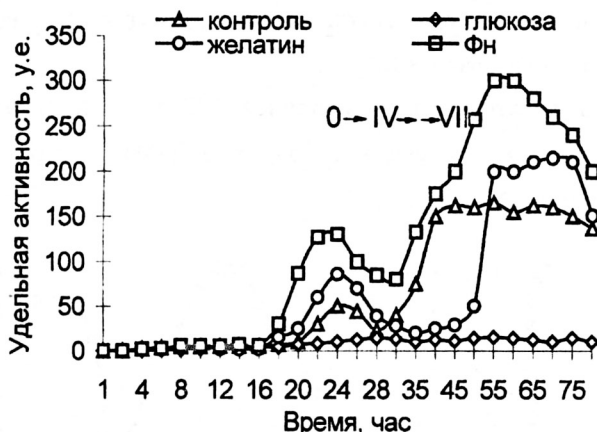


Рис. 8. Активность по гидролизу казеина во время роста и спорообразования *B. intermedius* на средах с 1% желатином, 0.01% Na_2HPO_4 , 5 мМ CaCl_2 , 1% глюкозой и 1% лактатом. 0 — VII - стадии спорообразования. $\sigma < 12\%$.

Итак, *B. intermedius* во время пост-экспоненциального роста выделяют фосфатазу и РНКазу, на этапе инициации спорообразования - тиолзависимую протеиназу, на стадиях спорообразования - фосфатазу и протеиназу. Интенсивный синтез гидролитических ферментов происходит, когда рост клеток замедляется

или останавливается и снижается скорость синтеза белка. Одним из способов стабилизации мРНК в этот период может являться полиаденилирование.

3.2. Взаимосвязь синтеза мРНК и синтеза гидролитических ферментов *B. intermedius*. О скорости синтеза поли(А)⁺РНК в клетках *B. intermedius* судили по скорости включения ³Н-уридина, добавленного в среду роста (рис. 9).

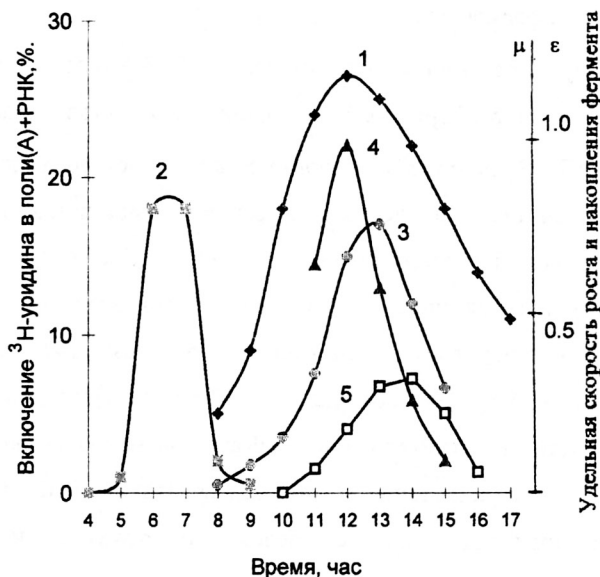


Рис. 9. Динамика синтеза поли(А)⁺РНК в клетках *B. intermedius*. 1 - включение ³Н-уридина в поли(А)⁺РНК; 2 - удельная скорость роста, μ. Удельная скорость накопления ферментов, ε: 3 - РНКазы, 4 - фосфатазы, 5 - протеиназы. 100% - импульс-меченая сРНК. σ<15%.

Максимальное накопление поли(А)⁺РНК происходит в фазе замедления роста бактерий, когда удельная скорость синтеза внеклеточных ферментов (РНКазы, фосфатазы и протеиназы) достигает максимального значения. Введение в среду Фн приводит к резкому снижению синтеза фосфогидролаз и увеличению синтеза внеклеточных протеиназ (в 3 раза). С помощью радиоактивной метки установлено, что содержание поли(А)⁺РНК у бактерий, выращенных на среде с Фн, (казеинолитическая активность 40±3% ед/мл), составляет - 2.99×10⁻⁴ мг на опт. ед. биомассы. У микроорганизмов, выращенных на среде без Фн (казеинолитическая активность - 9±5% ед/мл), содержание поли(А)⁺РНК

составляет 1.18×10^{-4} мг на опт. ед. биомассы, т. е. в 3 раза меньше. Совпадение динамики синтеза поли(А)⁺РНК и динамики синтеза внеклеточных ферментов на бесфосфорной среде, а также корреляция между накоплением поли(А)⁺РНК и синтезом протеиназ у бактерий на среде, обогащенной неорганическим фосфатом, свидетельствуют о возможном участии полиаденилированных РНК в синтезе внеклеточных ферментов.

3.3. Изучение продуктов трансляции бактериальной поли(А)⁺РНК.

Проводили электрофоретический анализ продуктов трансляции сРНК и поли(А)⁺РНК *B. intermedius* в ооцитах шпорцевой лягушки. После инъекции бактериальной РНК на электрофореграммах гомогенатов ооцитов появляются фракции низкомолекулярных белков (47-10 кДа). Среди них присутствуют белки, электрофоретическая подвижность которых совпадает с Rf соответствующих внеклеточных гидролаз *B. intermedius*: фосфатазы (47 кДа), тиолзависимой протеиназы (32.5 кДа) и рибонуклеазы (12.5 кДа). Проведенный с применением антисыворотки к внеклеточной РНКазе, иммуноэлектрофорез гомогенатов ооцитов после трансляции в них бактериальной РНК показал, что среди продуктов трансляции имеется белок, по структуре идентичный РНКазе. Гомогенаты ооцитов, в которые инъецировали сРНК и поли(А)⁺РНК бактерий, применяли для проведения иммуноферментного анализа. Результаты показали, что оптическая плотность (OD₄₉₂), соответствующая гомогенатам ооцитов с бактериальной сРНК, составляет $0.145 \pm 7\%$, с поли(А)⁺РНК - $0.245 \pm 10\%$, с буфером без РНК - $0.08 \pm 10\%$. Прирост OD₄₉₂ свидетельствует, что в ооцитах среди продуктов трансляции присутствует белок, идентичный РНКазе. Прирост OD₄₉₂ выше, когда в ооцитах транслируется поли(А)⁺РНК. Электрофоретический и иммунологический анализ продуктов трансляции мРНК *B. intermedius* позволяет предположить, что, по крайней мере, часть мРНК, а именно та, которая направляет синтез внеклеточных гидролаз в период их интенсивной секреции в среду, полиаденилирована.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Сравнительная характеристика структуры, каталитических и физико-химических свойств исследуемых гидролаз *B. intermedius*. Изучена белковая секреция у бацилл на примере полипептидов, различных по физико-химическим характеристикам. Объектом являлись спорообразующие бактерии *B. intermedius* - продуценты внеклеточной гуанилспецифичной РНКазы. Фермент имеет молекулярную массу 12.3 кДа, содержит 109 аминокислот, подробно охарактеризован и доступен в препаративных количествах. Белок устойчив к тепловому воздействию в широком диапазоне pH 2.5-11, что достигается высоким содержанием в молекуле белка ароматических аминокислот (Голубенко *с соавт.*, 1981, 1982; Гришина *с соавт.*, 1989). Особенностью фермента является отсутствие серусодержащих аминокислот. РНКазы использована нами для изучения секреции высоко стабильного белка, фолдинг которого зависит от скорости формирования в молекуле элементов вторичной структуры при физиологических значениях pH и не зависит от ионов металлов (Гришина *с соавт.*, 1989).

Другими белками для изучения секреции явились щелочная фосфатаза и сериновая протеиназа, информация о которых для *B. intermedius* к началу работы отсутствовала. В литературе имеются сведения о сериновых протеиназах и щелочных фосфатазах других бацилл (Betzel *et al.*, 1990; Hulett *et al.*, 1990, 1991; Руденская, 1994). Выделение и характеристика ферментов у *B. intermedius* стали возможны после получения стрептомицинустойчивых штаммов с высоким выходом этих белков и установлены условия для оптимальной продукции ферментов.

Известно, что при переходе от экспоненциальной к стационарной фазе роста экспрессия генов определяется системами сигнальной трансдукции (Hulett, 1996; Fabret *et al.*, 1999). Эти системы получают сигналы из окружающей среды, интегрируют информацию и определяют программу ответа на поздней фазе роста. Процессы, которые контролируются системами сигнальной трансдукции, включают споруляцию, дыхание, синтез и секрецию гидролитических ферментов

и др. Фосфат-лимитирующие условия являются, возможно, наиболее характерными для бацилл. В зависимости от степени истощения среды по Фн клетки способны активировать серию ответов, включая синтез и секрецию фосфатазы и РНКазы.

В процессе роста *B. intermedius* в культуральной жидкости обнаружены два пика фосфатазной активности - в фазе замедления роста и в стационарной фазе роста. Активность, соответствующая первому пику, резко понижается на среде, содержащей Фн, изменяется в зависимости от природы и концентрации источника углерода, повышается на среде с 0.1 мМ Co^{2+} . Факт снижения активности фосфатазы в присутствии Фн свидетельствует, что ген белка находится в составе Pho-регулона и контроль синтеза фермента осуществляется PhoP/PhoR регуляторной парой по аналогии с фосфатазами *B. subtilis* и *B. licheniformis* (Hulett, 1996; Kim *et al.*, 1998). В настоящее время открыта другая сигнал-трансдуцирующая система ResD/ResE, которая контролирует дыхание и, как установлено, необходима для полной индукции Pho-регулона (Nakano *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996a,b). Возможно, выявленная зависимость синтеза фосфатазы от природы источника углерода является следствием взаимодействия этих систем контроля. Активность фосфатазы второго пика не зависит от присутствия Фн в среде, что указывает на присутствие другого механизма регуляции синтеза соответствующего фермента. Изучение динамики спорообразования показало, что второй пик по времени соответствует II стадии формирования споры. У *B. subtilis* секвенированы два структурных гена щелочной фосфатазы, *phoA* и *phoB* (Hulett *et al.*, 1991). Они имеют структурную гомологию в каталитическом центре, сайтах связывания металлов и фосфата, которые консервативны для известных бактериальных и эукариотических фосфатаз (Hulett, 1991). Во время споруляции экспрессия *phoA* резко снижалась, а *phoB* продолжалась (Lee *et al.*, 1991). Промоторная область *phoB* обнаружила тандем из P_v - и P_s -промоторов (Liu and Hulett, 1997). Транскрипция P_v определялась *phoP/phoR* генами, а транскрипция P_s зависела от *spo0* генов и в определенной степени от *spoII* генов (Hoch, 1993).

В отличие от фосфатаз *B. subtilis* фосфатаза *B. intermedius* (46 ± 2 кДа) обладала ФМЭ и ФДЭ активностью. Термостабильность и pH-стабильность, ЭДТА-чувствительность, действие различных ингибиторов и ионов металлов одинаковы для ФМЭ и ФДЭ. Особенностью молекулы является отсутствие остатков со свободной SH-группой или -S-S-связей. Фермент чувствителен к действию хелатирующих агентов и активируется в присутствии Co^{2+} и Ca^{2+} , что связано с участием металлов в формировании активного центра белка. Узкий интервал стабильности pH 8.0-10.5, диапазон термоинактивации (утрата активности при 60°) и отсутствие -S-S- мостиков свидетельствуют о лабильности фосфатазы.

Описан белок с аналогичными свойствами - фосфатаза PhoD *B. subtilis* (46 кДа), ген которой клонирован и секвенирован (Eder *et al.*, 1996). Последовательность не показала гомологии к ранее выделенным фосфатазам бацилл, консервативным по активному и функциональным сайтам (Hulett *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1998). Очевидно, существуют фосфатазы, отличающиеся по строению активного центра, обеспечивающего проявление двух каталитических функций. Тот факт, что один белок катализирует две различные реакции гидролиза, существенно расширяет метаболические функции этих фосфатаз, позволяя увеличить арсенал расщепляемых ферментом субстратов. Бактерии способны переключаться с расщепления одного субстрата на другой и максимально использовать ресурсы среды.

Щелочная фосфатаза *B. intermedius* обнаружена в клеточных фракциях и культуральной жидкости. Способность фермента выделяться в среду и его преимущественная локализация в поверхностных структурах клетки - в мембране и клеточной стенке, являются очевидными признаками экзофермента. Изменение относительного содержания этого фермента в указанных фракциях в зависимости от условий культивирования и возраста культуры может означать, что эти факторы влияют на эффективность секреции фермента в среду. Различия в спектре множественных молекулярных форм фермента, локализованного в разных компартментах, могут отражать этапы в образовании зрелых форм фосфатазы. Мембраносвязанная фосфатаза стабилизируется ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Заякорение фермента в мембране, по-видимому, необходимо для стабилизации белка и сохранения его в каталитически активной форме, устойчивой к внеклеточному протеолизу. Показано, что молекула PhoD-фосфатазы имеет общий положительный заряд (Eder *et al.*, 1996) и способна взаимодействовать с отрицательно заряженной клеточной стенкой, содержащей тейхоевые кислоты, насыщенные фосфодиэфирными связями (Archibald *et al.*, 1993). Когда среда истощается по фосфату, тейхоевая кислота замещается тейхуроновой, не содержащей фосфатов (Mauël *et al.*, 1991). Пока индуцируются гены синтеза тейхуроновой кислоты, фосфатаза, обладающая ФМЭ и ФДЭ активностями, может расщеплять фосфодиэфирные связи тейхоевой кислоты (Liu *et al.*, 1998).

Другим белком для изучения секреции *in vivo* у *B. intermedius*, является сериновая протеиназа. Биосинтез экзофермента и фермента, связанного с клеточной поверхностью, подавляется легко метаболизируемыми источниками углерода. Казеин и желатин активируют синтез ферментов. Тиолзависимая протеиназа очищена из пула внеклеточных протеиназ *B. intermedius*. Интервал стабильности pH 6.3-11 для протеиназы шире, чем для фосфатазы (pH 8.0-10.5), но существенно меньше по сравнению с РНКазой (pH 2.5-11). Диапазон термоинактивации, повышение термостабильности белка в присутствии Ca^{2+} , устойчивость к денатурирующим и хелатирующим агентам свидетельствуют об относительной стабильности фермента. По-видимому, ионы Ca^{2+} участвуют в поверхностной стабилизации молекулы фермента и экранируют внутренние структуры, включая активные сайты. Данные ингибиторного анализа указывают на присутствие серина в активном центре, а также о близко расположенном к нему цистеину, способному влиять на активность фермента, что позволяет отнести протеиназу *B. intermedius* к подгруппе тиолзависимых субтилизиноподобных сериновых протеиназ по аналогии с термитазой (Степанов *с соавт.*, 1980), протеиназой К (Betzel *et al.*, 1988) и протеиназой *Str. thermovulgaris* (Хайдарова *с соавт.*, 1990).

Ca^{2+} -связывающие сайты идентифицированы в 3D-структуре (разрешение 1.4 Å) термитазы и протеиназы К (Betzel *et al.*, 1990). Несмотря на низкую гомологию

последовательностей, четвертичная структура этой группы белков высоко консервативна. Стабилизация структуры этих белков достигается иммобилизацией Ca^{2+} поверхностными сайтами и присутствием в структуре -S-S- связей. В результате оба фермента относительно устойчивы к нагреванию и денатурирующим агентам.

Тиолзависимая протеиназа *B. intermedius* обладает широкой субстратной специфичностью. Фермент проявляет максимальную активность на субтилизиновых субстратах Glp-Ala-Ala-Leu-pNA и Z-Ala-Ala-Leu-pNA, предпочтительно гидролизует амидные связи, образованные карбоксильными группами остатков лейцина и фенилаланина. Для субтилизинов наблюдается выраженная зависимость активности от природы аминокислот, предшествующих атакуемой связи (явление вторичной специфичности), что также характерно для протеиназы *B. intermedius*: ее удельная активность по субстрату Z-Ala-Ala-Leu-pNA почти в 6 раз превышает активность по субстрату Z-Ala-Gly-Leu-pNA. Структура сайта расщепления для протеиназы *B. intermedius* соответствует общей характеристике сайта расщепления для сигнальной пептидазы. При гидролизе В-цепи окисленного инсулина протеиназа более эффективно гидролизует связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных аминокислот Leu, Tyr, Phe, а также Ser, Gln и других и не гидролизует связи, образованные дикарбоновыми кислотами. Расщепление связей, образованных дикарбоновыми кислотами, катализирует глутамилэндопептидаза, обнаруженная нами в мембране (до 60%) и пуле внеклеточных протеиназ (12%). Функциональное взаимодополнение этих ферментов значительно расширяет возможности для процессинга, что особенно важно для бацилл, которые, как известно, выделяют в среду много различных гидролитических ферментов и пептидов (токсины, пептидные антибиотики и т.д.). Белковая секреция бацилл характеризуется множественным процессингом, приводящему к поэтапному отщеплению участков пропептидной последовательности предшественника. Таким образом, данные по специфичности фермента представляют особый интерес для прогнозирования участков процессинга внеклеточных гидролаз.

По составу аминокислот фермент близок субтилизиноподобным тиолзависимым протеиназам, которые, в отличие от обычных субтилизинов, содержат цистеин и цистин. В составе аминокислот протеиназы *B. intermedius* обнаружены 1-3 остатка полуцистина на молекулу, один из которых, возможно, цистеин. В этом отношении фермент также близок протеиназе К, в структуре которой идентифицирован цистеин, близко расположенный к активному центру, и еще 4 цистеина, образующие 2 дисульфидные связи. Полученные данные позволяют предположить, что пространственная структура протеиназы *B. intermedius* близка структуре протеиназы К и термитазы.

Итак, бактерии *B. intermedius* в пост-экспоненциальный период роста выделяют в среду РНКазу (12.3 кДа), фосфатазу (46 кДа) и протеиназу (32 кДа). Ферменты отличаются по физико-химическим характеристикам. РНКазы являются белком с плотно упакованным гидрофобным ядром, в структуре которого отсутствуют -S-S- связи, для протеиназы характерно присутствие остатков цистина и способность к иммобилизации ионов кальция, фосфатаза является лабильным белком и активна в присутствии ионов металлов.

2. Особенности локализации и секреции гидролитических ферментов *B. intermedius*. Установлено, что в культуральной жидкости *B. intermedius* доминирующим ферментом является РНКазы. В клеточной стенке наблюдается более равномерное распределение ферментов. На среде без Фн в фазе замедления роста преобладает фосфатаза (65%), что отражает потребность бактерий в ферменте, способном отщеплять фосфаты от различных субстратов, включая тейхоевые кислоты. В стационарной фазе наряду с фосфатазой (45%) возрастает доля РНКазы (до 47%). На среде с Фн в клеточной стенке преобладает протеиназа (48-56%). При этом 32% составляет фосфатаза. Хотя на среде с Фн бактериям нет необходимости в секреции фосфатазы, клетки частично сохраняют фермент в поверхностном слое. В цитоплазме РНКазная и казеинолитическая активность была низкой, 95% приходится на фосфатазу.

Сравнительное содержание гидролаз в культуральной жидкости указывает, что эффективнее других ферментов секретируется РНКазы. Выход фермента

максимален на среде с глюкозой и не зависит от ионов Ca^{2+} (5 мМ) в среде. Неорганический фосфат репрессирует биосинтез внеклеточной РНКазы и РНКазы, локализованной в клеточной стенке; причем, в присутствии Фн происходит задержка выхода фермента в среду с клеточной поверхности. Активная РНКазы не обнаружена в цитоплазме и мембране. Иммунный ответ клеточных фракций выражен в отношении клеточной стенки и отсутствует для мембраны и цитоплазмы. Энзимограммы РНКаз показали, что в цитоплазме преобладают белки с высокой электрофоретической подвижностью. В клетках обнаружены три молекулярные формы РНКазы, которые в разной степени реагируют с кроличьей антисывороткой против внеклеточной РНКазы и, видимо, являются предшественниками фермента. РНКазы не задерживаются клетками, а по мере синтеза секретируются в среду. Аналогичные данные получены при изучении локализации РНКазы *B. subtilis*, секретируемой в культуральную жидкость (Merchante *et al.*, 1995). Авторы отмечают полное отсутствие активности РНКазы в мембранной фракции и цитоплазме и предполагают, что РНКазы являются репортерным белком периплазмы бацилл.

По данным американских авторов барназы, структурный гомолог РНКазы *B. intermedius* (биназы), секретируется *B. amyloliquefaciens* пост-трансляционно (Chen and Nagarajan, 1993). Из клеток *B. amyloliquefaciens* выделен ингибитор барназы, барстар (89 аминокислот), в отсутствие которого синтез фермента летален для бактерий (Hartley, 1988). Показано, что присутствие ингибитора существенно замедляет секрецию барназы (Chen and Nagarajan, 1993). Мы предприняли попытку выделения белка, обладающего ингибиторной активностью в отношении биназы, из клеток *B. intermedius*. Выделенный белок характеризуется высокой лабильностью, что отличает его от барстара. Мы предполагаем, что он неспецифически взаимодействует с биназой и, возможно, функционирует как молекулярный шаперон при пересечении ферментом мембраны. В сохранении предшественника в статусе, компетентном для транслокации, участвует также сигнальная последовательность (Liu *et al.*, 1989). Показано, что сигнальные пептиды щелочной протеазы, нейтральной протеазы и левансахаразы различных

бацилл секретируют барназу эффективнее, чем собственный сигнальный пептид (Chen and Nagarajan, 1993). Таким образом, очевиден факт замедления в экспорте барназы за счет сигнального пептида.

Полностью денатурированная молекула барназы скручивается *in vitro* до нативной конформации за 5-10 сек (Hartley, 1989). Гистидин, необходимый для катализа, не участвует в фолдинге белка. Поскольку формирование третичной структуры барназы и биназы происходит аналогичным путем (Serrano *et al.*, 1992), мы можем применить эти данные для биназы. Спонтанное скручивание ферментов до нативной конформации *in vivo*, замедляется взаимодействием с шапероном (или ингибитором), либо с сигнальной последовательностью. Обнаруженные нами три фракции РНКазы в клетках *B. intermedius*, реагирующих с антисывороткой к внеклеточной РНКазе, могут отражать этапы шапероно-зависимого фолдинга, при котором происходит поэтапное освобождение молекулы РНКазы, приводящее к образованию зрелого фермента. Процесс происходит параллельно с процессингом предшественника, что следует из данных о полной последовательности генов биназы и барназы, которые содержат дополнительные последовательности из 53 и 39 аминокислот, соответственно (Paddon, Hartley, 1986; Paddon *et al.*, 1989; Шульга *с соавт.*, 1994; Знаменская *с соавт.*, 1999). Процесс сопровождается поэтапным формированием элементов вторичной структуры в молекуле РНКазы. Представляло интерес получить модифицированные РНКазы *B. intermedius* с нарушениями во внутримолекулярных структурах белка. Фермент содержит три остатка триптофана, участвующих в образовании разных функциональных доменов структуры молекулы (Голубенко *с соавт.*, 1981, 1982; Гришина *с соавт.*, 1989). Trp34 участвует в формировании N-концевой α -спирали, Trp70 участвует в формировании β -структуры, которая участвует в упаковке гидрофобного кора (Pavlovsky *et al.*, 1989). РНКазы с заменами Trp34Asn и Trp70Asn получены сайт-направленным мутагенезом. Данные о локализации мутантных белков позволили установить взаимосвязь между секрецией белка и формированием элементов вторичной структуры в молекуле фермента. Так, замена Trp34, вызывающая

изменения в формировании N-концевой α -спирали РНКазы, приводит к блокированию транслокации, но не препятствует взаимодействию белка с мембраной. Отсутствие Trp70Asp-РНКазы в клеточных фракциях рекомбинантного штамма *E. coli* может означать, что нарушение в образовании β -структурного слоя блокирует связь белка с мембраной и препятствует его секреции. Формирование вторичных структур происходит, когда белок находится в нескрученном состоянии за счет функционирования шаперонов или сигнального пептида. Известно, что элементы вторичной структуры белка, α -спираль и β -структура, определяют *in vivo* эффективность внедрения в мембрану (Heijne, 1992). Мы предположили, что транслокация РНКазы, содержащей три α -спирали и восемь антипараллельных β -структур, может происходить путем инверсии через липидную часть мембраны за счет частичного образования элементов вторичной структуры по аналогии с механизмом транслокации белка gpVIII фага M13 (Pugley, 1993).

Нами установлено, что секреция фосфатазы и протеиназы *B. intermedius* отличается от экспорта РНКазы присутствием мембраносвязанной формы. Известно, что фосфатазы и протеиназы бацилл синтезируются с дополнительной пропоследовательностью (Eder *et al.*, 1996; Simonen and Palva, 1993). Пропептиды субтилизинов функционируют как внутримолекулярные шапероны, способные сохранять компетентную для транслокации конформацию предшественника. Пропептиды фосфатазы относятся к категории коротких пропептидов с предполагаемой функцией заякоривания белка на мембране (Pugsley, 1993).

Особенностью в клеточном распределении фосфатазы *B. intermedius* является преимущественная локализация фермента в мембране, которая необходима для сохранения белка в каталитически активной форме, устойчивой к протеолизу. Внеклеточная фосфатаза *B. intermedius* нестабильна и быстро инактивируется. Он репрессирует синтез внеклеточного и мембраносвязанного ферментов. В условиях увеличения выхода фосфатазы активность обоих ферментов возрастает, причем в мембране фермент, по-видимому, накапливается до уровня насыщения дискретных сайтов секреции. Показано, что для мембраносвязанной ВСб-

фосфатазы *B. subtilis*, обладающей ФМЭ и ФДЭ активностью, интервал pH-стабильности и термостабильности шире, чем для экзофермента (Yamane and Maguo, 1978). Нами установлена ключевая роль Co^{2+} при освобождении фосфатазы *B. intermedius* с мембраны. Как предполагают французские исследователи (Petit-Glatron *et al.*, 1993, 1995), у бацилл мембранный градиент катионов (Ca^{2+} и Fe^{3+}) действует, как сила, управляющая освобождением с мембраны белков, в структуре которых имеются сайты связывания металлов, катализируя их фолдинговую реакцию. Данные об активации фосфатазы *B. intermedius* Co^{2+} и Ca^{2+} свидетельствуют о возможности фолдинга фермента в окружении клеточной стенки, насыщенной ионами металлов.

Ca^{2+} -зависимые сайты обнаружены методами кристаллографии в структуре многих секретируемых ферментов. Субтилизины BPN' и Карлсберг обладают двумя сайтами с высоким и низким сродством к Ca^{2+} (Pantoliano *et al.*, 1988). Последний связывает Ca^{2+} только в Ca^{2+} -обогащенной среде (>40 mM). Сайты с низким сродством вовлечены в секрецию, если белки находятся в слое клеточной стенки, которая способна к его мобилизации (Beveridge, 1994). Высокая концентрация Ca^{2+} (>2 mM) в клеточной стенке сохраняется даже после полной утилизации ионов металла в среде (Petit-Glatron *et al.*, 1993). Термитаза и протеиназа K, по свойствам близкие тиолзависимой протеиназе *B. intermedius*, являются Ca^{2+} -связывающими белками (Betzl *et al.*, 1990). Данные, полученные при характеристике протеиназы *B. intermedius*, свидетельствуют о возможном присутствии в структуре белка сайтов, способных к мобилизации Ca^{2+} .

При выращивании *B. intermedius* в среде, содержащей Ca^{2+} (5 mM), происходит повышение выхода внеклеточной протеиназы в среднем на 20%. При фракционировании клеток установлено, что происходит равнозначное снижение активности мембраносвязанного фермента. Эти данные вместе с данными о влиянии Ca^{2+} на повышение стабильности протеиназы свидетельствуют о необходимости Ca^{2+} на этапе освобождения фермента с мембраны и участии Ca^{2+} в фолдинге белка. Факт обнаружения протеиназы в клеточной стенке в условиях интенсивного синтеза и секреции фермента может быть следствием недостатка

ионов Ca^{2+} для успешного завершения фолдинга всего секретируемого фермента. Это может указывать на ограниченное количество в клеточной стенке сайтов с мобилизованным Ca^{2+} , которые благоприятны для конформационного перехода Ca^{2+} -содержащих белков.

Изучение секреции протеиназы *B. intermedius* в различных условиях культивирования показало, что преобладает доля внеклеточного фермента. Секреция основного количества синтезируемых протеиназ в среду отражает физиологическую роль этих ферментов в катаболизме. За счет функционирования протеиназ в стационарной стадии сохраняется высокая скорость белкового обмена, что способствует образованию споры за счет экзогенных источников. Каталитически активный фермент (<10%) обнаружен в мембранах *B. intermedius*. По сведениям литературы в секреции субтилизина *B. subtilis* активный фермент первоначально обнаружен в мембране (Power *et al.*, 1986). В разных условиях выращивания тиолзависимая протеиназа не обнаружена нами в цитоплазме *B. intermedius*. Данные согласуются с фактом, что предшественники субтилизинов содержат в структуре внкотримолекулярные шапероны, которые участвуют в формировании неактивной конформации фермента в цитоплазме (Pugsley, 1993; Nagarajan, 1993).

Полученные нами данные о секреции трех гидролитических ферментов *B. intermedius*, отличающихся по физико-химическим характеристикам, свидетельствуют о различии в локализации этих ферментов. Активная РНКазы обнаружена в клеточной стенке (< 1%), 99% белка секретируется в среду. Активная протеиназа локализована в мембранах (<10%), в клеточной стенке фермент обнаружен в максимально индуцированных клетках (0.01%). Фосфатаза локализована в мембране, клеточной стенке и культуральной жидкости, причем в мембране в количестве до 70%.

Различны способы освобождения этих ферментов в среду. Для РНКазы характерно самостоятельное формирование активной конформации, которое в клетках замедляется взаимодействием с шапероном, либо с сигнальным пептидом и реализуется после того, как белок пересекает мембрану. Ключевую роль в

освобождении фосфатазы играют ионы двухвалентных металлов и прежде всего Co^{2+} , тогда как фолдинговый переход протеиназы, сопровождающийся освобождением с мембраны в среду, зависит от насыщения клеточной стенки ионами Ca^{2+} . Данные экспериментов с мутантными РНКазами позволяют предположить, что элементы вторичной структуры в молекуле фермента важны для секреции белка. Возможно, транслокация РНКазы происходит путем спонтанной инверсии через мембрану. Полученные данные свидетельствуют, что свойства белков накладывают отпечаток на их локализацию и, возможно, пути секреции. Очевидно, при освобождении в среду у бацилл реализованы различные пути экспорта, которые определяются структурными особенностями полипептидов.

3. Физиологическая роль секретируемых гидролитических ферментов *B. intermedius*. Как установлено, в период пост-экспоненциального роста, бактерии *B. intermedius* секретируют РНКазу, щелочную фосфатазу и сериновую протеиназу. Два первых фермента являются Pho-регулон зависимыми, синтезируются и секретируются в условиях истощения среды по Фн для продолжения вегетативного роста. РНКазы расщепляет РНК до олигонуклеотидов, которые могут быть субстратами для фосфатазы, чтобы продуцировать нуклеозиды и Фн, поглощаемые клетками. Известно, что монофосфаты не проникают через клеточную мембрану (Senesi *et al.*, 1981). Синтез и секреция сериновой протеиназы *B. intermedius*, наоборот, активируются на среде с Фн. Физиологическая роль этого фермента связана с инициацией спорообразования (Power *et al.*, 1986). Нами показано, что оба процесса, синтез тиолзависимой сериновой протеиназы и инициация споруляции, корегулируются экзогенной глюкозой. По данным литературы экспрессию *argE* и *prgE* генов, кодирующих щелочную и нейтральную протеиназы *B. subtilis*, контролируют две регуляторные системы: DegS-DegU и SpoOA-фосфоответ (Hoch, 1993; Strauch, 1993). Пока неясно, какие внешние сигналы активируют системы контроля, связанные со споруляцией. Изолированы мутанты *B. subtilis*-*opp* по олигопептидному транспорту, которые в то же время дефектны по спорообразованию (Perego *et al.*,

1991; Rudner *et al.*, 1991). Предполагается, что определенные пептиды, продукты расщепления белков протеиназой, поступают в клетки из среды и участвуют либо в регуляции транспорта фосфата, либо в прямой или опосредованной активации спороспецифичных σ -факторов транскрипции поздних генов. Пептиды могут быть узнаны Орр системой, вовлеченной в споруляцию (Perego *et al.*, 1991). Вход внешних сигналов также способен контролировать активность AbrB, Hpr, Sin-регуляторов, которые связаны с переключением на системы контроля за споруляцией (Strauch, 1993; Ordal *et al.*, 1993; Hoch, 1993).

Наряду с секрецией тиолзависимой сериновой протеиназы, максимум которой совпадает с 0 стадией спорообразования у *B. intermedius*, на VII стадии спорообразования нами обнаружена внеклеточная протеиназа, расщепляющая казеин. Активность фермента в 2-3 раза превышала казеинолитическую активность на 0 стадии споруляции. Образование споровой оболочки нуждается в интенсивном синтезе белка и, возможно, олигопептиды и аминокислоты, образующиеся в результате расщепления, вовлекаются в этот процесс. На границе II и III стадий спорообразования *B. intermedius* обнаружен второй пик активности фосфатазы, синтез которой, видимо, связан со споруляцией. Синтез этого фермента не регулируется экзогенным Фн. Известно, что транскрипция фосфатазы на этой стадии у *B. subtilis* запускается с P_s промотора и синтез фермента не является Pho-регулон зависимым (Liu and Hulett, 1997). По нашим данным на этом этапе изменяется состав молекулярных форм фосфатаз в клетках *B. intermedius*. По сведениям литературы специфические фосфатазы, синтез которых резко возрастает на этом этапе, играют ведущую роль в поддержании полирибонуклеотидного обмена. В этот период в клетках фактически останавливается биосинтез *de novo* пуринов и пиримидинов (Senesi *et al.*, 1981). Специфические фосфатазы участвуют в непрерывной рециркуляции РНК путем дефосфорилирования мононуклеотидов, что приводит к постоянной скорости синтеза РНК. Вместе с тем, на этом этапе существенно возрастает роль мембраносвязанных фосфатаз, способных к дефосфорилированию экзогенных

моноклеотидов, которые поступают в клетки в виде соответствующих нуклеозидов и способны включаться в синтез РНК.

Гидролазы, секретируемые *B. intermedius* в пост-экспоненциальный период, участвуют в катаболизме. Удельная скорость накопления ферментов в культуральной жидкости нарастает в период, когда удельная скорость роста культуры падает. Активный синтез и секреция ферментов сопровождаются интенсификацией транскрипции и трансляции соответствующих белков. Нами показано, что одним из возможных способов поддержания синтеза белка на высоком уровне является стабилизация соответствующих мРНК путем полиаденилирования. Результаты иммунологического и электрофоретического изучения продуктов трансляции бактериальной поли(А)⁺РНК *in vitro* свидетельствуют, что хотя бы часть мРНК соответствующих гидролаз в клетках *B. intermedius* полиаденилирована. Наличие полиаденилированной мРНК подтверждено тем, что показана принципиальная возможность синтеза комплементарной ДНК на матрице поли (А)+РНК, полученной из клеток *B. intermedius* (Ромахина, 1991).

Интерес представляют данные о корреляции между уровнем синтеза протеиназы на среде с Фн и содержанием поли(А)⁺РНК. У *B. subtilis* обнаружен ген *prtR*, который значительно увеличивал продукцию щелочной и нейтральной протеиназ и не действовал на продукцию РНКазы и щелочной фосфатазы (Tanaka *et al.*, 1987). Генетические исследования показали, что продукт гена взаимодействовал с промоторной областью генов протеиназ, вследствие чего увеличивался уровень мРНК соответствующих белков.

РНКазы и протеиназы являются ферментами эндонуклеолитического типа действия и атакуют высокомолекулярные соединения в качестве субстратов (белки и нуклеиновые кислоты). По сведениям литературы органические вещества с молекулярной массой ≥ 60 кДа не проникают через матрикс клеточной стенки (Merchante *et al.*, 1995). Бактерии вынуждены мобилизовать механизм экспорта внеклеточных гидролитических ферментов. Выполнение физиологической функции гидролаз зависит от времени жизни в окружающей среде, увеличение

которого достигается путем стабилизации структуры белка с относительно небольшой молекулярной массой (до 60 кДа). В отличие от РНКазы и протеиназы, фосфатаза способна отщеплять P_i от низкомолекулярных субстратов, отдавая предпочтение мононуклеотидам, а также как в случае фосфатаз *B. intermedius* и *B. subtilis* (Eder *et al.*, 1996), способна расщеплять в дополнение ФМЭ еще и ФДЭ связи, например, в отношении тейхоевых кислот. Клеткой реализован механизм экспорта, приводящий к заякориванию белка на мембране. Синтез последнего, вместе с синтезом мембранных белков системы транспорта неорганического фосфата (Qi and Hulett, 1998; Liu *et al.*, 1998), находится под контролем Pho-регуляции. Мембрана, в то же время, способствует стабилизации белковой глобулы, чтобы обеспечить выполнение метаболической функции этого фермента. Таким образом, существование у бацилл различных механизмов для вывода белков в среду позволяет бактериям быстро адаптироваться к окружающим условиям.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что в период пост-экспоненциального роста бактерии *B. intermedius* наряду с рибонуклеазой секретируют щелочную фосфатазу и сериновую протеиназу. В отличие от РНКазы, выход ферментов возрастал в присутствии в среде ионов Co^{2+} и Ca^{2+} соответственно. Активирующее действие на выход фосфатазы оказывали отсутствие в среде ортофосфата, низкие концентрации источников углерода (глюкоза, пируват, лактат - 5 мг/мл) и мононуклеотиды (0.02 мг/мл), на выход протеиназы - отсутствие глюкозы, присутствие в среде ортофосфата (0.2 мг/мл) и желатина (10 мг/мл).

2. Впервые выделены в гомогенном состоянии субтилизиноподобная тиолзависимая сериновая протеиназа (32.5 кДа) и щелочная фосфатаза (46 кДа), обладающие широкой субстратной специфичностью. Фосфатаза имеет фосфомоно- и фосфодиэстеразную активность, которые равнозначно активируются ионами Co^{2+} и Ca^{2+} . Протеиназа обладает чувствительностью к

реагентам на тиоловые группы, ионы Ca^{2+} участвуют в стабилизации белка. По сравнению с РНКазой, стабильной при pH 2-10 и устойчивой к нагреванию до 90° , протеиназа является относительно стабильным (pH 6.3-10.5; 10% инактивации за 30 мин при 55°), а фосфатаза лабильным белком (pH 8-10; 60% инактивации за 30 мин при 55°).

3. Выявлена различная степень эффективности секреции изучаемых белков в среду: активные фосфатаза (70%) и протеиназа (<10%) обнаружены в цитоплазматической мембране, в отличие от РНКазы, которая практически полностью освобождается бактериями в культуральную жидкость (>99%), активная РНКазы идентифицирована только в клеточной стенке (<1%). Образование внеклеточных гидролаз и соответствующих ферментов, локализованных в клеточной оболочке, корегулируется одинаковыми факторами.

4. Установлена необходимость участия ионов металлов (Co^{2+} и Ca^{2+}) в заключительном этапе секреции, а именно при освобождении в среду фосфатазы и протеиназы. Эффективность секреции РНКазы зависит от скорости формирования элементов вторичной структуры в молекуле белка. Замена аминокислоты Trp-34, участвующей в образовании N-концевой α -спирали в структуре фермента, приводит к блокированию его секреции.

5. Выявлено, что часть мРНК исследуемых ферментов *B. intermedius* полиаденилирована, вследствие чего увеличивается ее стабильность, способствующая сохранению высокого уровня синтеза гидролаз в фазах замедления и остановки роста культуры.

6. Показано, что физиологические функции фосфатазы и протеиназы, в отличие от РНКазы, не ограничиваются участием в катаболических процессах, а вносят свой вклад и в процесс спорообразования у бацилл.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

Статьи

1. Лещинская И.Б., Клейнер Г.И., Волкова Т.И., Балабан Н.П., Шарипова М.Р. Метод выделения и очистки щелочной рибонуклеазы *Bacillus intermedius*. Прикладная биохимия и микробиология, 1981. Т. XVII. Вып. 2. С. 241-246.
2. Шарипова М.Р., Филатова С.В., Винтер В.Г., Лещинская И.Б. Изучение внутриклеточных и внеклеточных рибонуклеаз *Bacillus intermedius*. Микробиология, 1984. Т. 53. Вып. 4. С. 563-567.
3. Шарипова М.Р., Вершинина В.И., Балабан Н.П., Лещинская И.Б. Синтез и секрция фосфогидролаз и протеазы *Bacillus intermedius*. Микробиология, 1987. Т. 56. Вып. 5. С. 805-811.
4. Ромахина Е.Р., Багаева Т.В., Шарипова М.Р., Козырева Е.А., Лещинская И.Б. Выделение и изучение полиаденилированной РНК из *Bacillus intermedius*. Микробиология, 1988. Т. 57. Вып. 3. С. 421-425.
5. Шарипова М.Р., Филатова С.В., Лещинская И.Б. Внутриклеточная ингибиторная активность РНКазы, секретируемой *Bacillus intermedius*. Микробиология, 1988. Т. 57. Вып. 4. С. 565-570.
6. Лещинская И.Б., Шарипова М.Р. Секрция ферментов спорообразующими бактериями (обзор). Успехи микробиологии, 1988. Т. 22. С. 70-81.
7. Шарипова М.Р., Ромахина Е.Р., Багаева Т.В., Балабан Н.П., Лещинская И.Б. Получение мРНК из протопластов спорообразующих бактерий и изучение продуктов ее трансляции. Микробиология, 1989. Т. 58. Вып. 3. С. 365-369.
8. Balaban N.P., Sharipova M.R., Golubenko I.A., Aphanasenko G.A., Volkova T.I., Vershinina V.I., Znamenskaya L.V., Leshchinskaya I.B. Physico-chemical characteristics of the ribonuclease *Bacillus intermedius*. In: Structure and chemistry of ribonucleases. Moscow, 1989. P. 349-354.
9. Шарипова М.Р., Волкова Т.И., Ермакова О.В., Лопатнев С.В. Выделение внутриклеточного ингибитора секретируемой РНКазы *Bacillus intermedius*. Прикладная биохимия и микробиология, 1991. Т. 27. Вып. 5. С. 673-679.
10. Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Вершинина В.И., Знаменская Л.В., Чернокальская Е.Б., Ромахина Е.Р., Волкова Т.И., Лопатнев С.В. Получение высокоочищенных бациллярных РНКаз из рекомбинантных штаммов *E. coli*. Биологические науки, 1992. No. 4. С. 68-74.
11. Чернокальская Е.Б., Ромахина Е.Р., Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Вершинина В.И., Лещинская И.Б. Клонирование и экспрессия структурного гена рибонуклеазы *Bacillus intermedius*. Биологические науки, 1992. No. 2. С. 338-345.
12. Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Усманова А.М., Ицкович Е.Л., Лещинская И.Б. Щелочная внеклеточная протеиназа *Bacillus intermedius*. Выделение, очистка и некоторые свойства фермента. Биохимия, 1993. Т. 58. Вып. 12. С. 1923-1928.
13. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Лещинская И.Б. Продукция внеклеточной щелочной фосфатазы антибиотикоустойчивыми штаммами *Bacillus intermedius*. Микробиология, 1994. Т. 63. Вып. 1. С. 52-58.

14. Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Ицкович Е.Л., Лещинская И.Б., Руденская Г.Н. Секретируемая сериновая протеиназа спорообразующих бактерий *Bacillus intermedius* 3-19. Биохимия, 1994. Т. 59. Вып. 9. С. 1393-1400.

15. Sharipova M.R., Balaban N.P., Itskovich E.L., Leshchinskaya I.B. Production and application of extracellular hydrolases from Bacilli. In: ICHEME- Fermentation Physiology. London, Chameleon Press, 1994. P. 31-33.

16. Lopoukhov L.V., Sharipova M.R., Rizvanov A.A. Influence of hydrophobic residues (Trp) substitutions on the secretion from *Bacillus intermedius*. Karadeniz Journal of Medical Sciences, 1995. V. 8. No. 4. P.

17. Sharipova M.R., Balaban N.P., Nekhotyayeva N.V., Mardanova A.M., Dementiev A.A., Leshchinskaya I.B. A novel *Bacillus intermedius* extracellular alkaline phosphatase: isolation, physico-chemical and catalytic characteristics. Biochemistry and Molecular Biology International, 1996. V. 38. No. 4. P. 753-761.

18. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Нехотяева Н.В., Ицкович Е.Л., Шакиров Е.В., Лещинская И.Б., Руденская Г.Н. Секретируемые гидролазы стрептомицинустойчивых бактерий *Bacillus intermedius*. Биохимия, 1996. Т. 61. Вып. 1. С. 110-118.

19. Лопухов Л.В., Шарипова М.Р. Современные исследования механизмов секреции белков. (Обзор). Деп. ВИНТИ № 2997-B96, 1996. 54 с.

20. Нехотяева Н.В., Вершинина О.А., Шарипова М.Р. Современные представления о механизме секреции белков у бацилл. (Обзор). Деп. ВИНТИ № 3301-B96, 1996. 28 с.

21. Вершинина О.А., Нехотяева Н.В., Шарипова М.Р. Щелочные фосфатазы бацилл. (Обзор). Деп. ВИНТИ № 131-B97, 1997. 23 с.

22. Ицкович Е.Л., Балабан Н.П., Марданова А.М., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р., Лещинская И.Б., Ксенофонов А.Л., Руденская Г.Н. Энзиматические свойства тиолзависимой сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* 3-19. Биохимия, 1997. Т. 62. Вып. 1. С. 60-65.

23. Leshchinskaya I.B., Shakirov E.V., Itskovich E.L., Balaban N.P., Mardanova A.M., Sharipova M.R., Viryasov M.B., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. Glutamyl endopeptidase of *Bacillus intermedius*, strain 3-19. FEBS Letters, 1997. V. 404. P. 241-244.

24. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Нехотяева Н.В., Дементьев А.А., Вершинина О.А., Гарусов А.В., Лещинская И.Б. Получение и характеристика секретируемой щелочной фосфатазы *Bacillus intermedius*. Биохимия, 1998. Т. 63. Вып. 10. С. 1385-1390.

25. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Скипина И.М., Нехотяева Н.В., Шилова М.А., Феоктистова Н.В. Внеклеточная щелочная фосфатаза *Bacillus intermedius*. Получение и характеристика. В сб.: Ферменты микроорганизмов. (н/ред. И.Б. Лещинская), Казань, 1998. С. 81-88.

26. Gabdrakhmanova L.A., Shakirov E.V., Balaban N.P., Sharipova M.R., Rudenskaya G.N., Leshchinskaya I.B. Biosynthesis and localization of glutamylendopeptidase from *Bacillus intermedius* strain 3-19. Microbios, 1999. V. 100. P. 97-108.

27. Шакиров Е.В., Габдрахманова Л.А., Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Руденская Г.Н., Лещинская И.Б. Влияние компонентов питательной среды на накопление глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости *Bacillus intermedius*. *Микробиология*, 2000. Т. 69. № 1. С. 29-33.

28. Sharipova M.R., Shakirov V.E., Gabdrakhmanova L.A., Balaban N.P., Kalacheva N.V., Rudenskaya G.N., Leshchinskaya I.B. Factors influencing the cellular location of proteolytic enzymes of *Bacillus intermedius*. *Medical Science Monitor*, 2000. V. 6. No. 1. P. 8-14

29. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Нехотяева Н.В., Лещинская И.Б. Влияние источников углерода и мононуклеотидов на продукцию внеклеточной щелочной фосфатазы *Bacillus intermedius*. *Микробиология*, 2000. Т. 69. № 2. С. 191-196.

30. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Лещинская И.Б. Локализация щелочной фосфатазы в клетках *Bacillus intermedius*. *Микробиология*, 2000. Т. 69. № 2. С. 197-202.

31. Шарипова М.Р., Шакиров Е.В., Балабан Н.П., Габдрахманова Л.А., Шилова М.А., Руденская Г.Н., Лещинская И.Б. Локализация протеолитических ферментов в клетках *Bacillus intermedius*. *Микробиология*, 2000. Т. 69. № 5. С. 660-667.

Тезисы докладов и материалы конференций

1. Leshchinskaya I.B., Znamenskaya L.V., Romakhina E.R., Sharipova M.R., Kapranova M.N. Studies of bacterial ribonuclease and phosphatase biosynthesis. In: The 15-th FEBS Meeting Abstracts. Brussel, Belgium, 1983. P. 238.

2. Шарипова М.Р., Филатова С.В., Шаги-Мухаметова Ф.Ф., Лещинская И.Б. Скрининг внутриклеточных ферментов спорообразующих бактерий. Тез. докл. и сообщ. междун. симпозиума ФЕМО. Регуляция микробного метаболизма факторами внешней среды. Пущино, 1983. С. 148-149.

3. Скуя А.Ж., Клейнер Г.И., Волкова Т.И., Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Лещинская И.Б. Получение бактериальной рибонуклеазы и ее лекарственных форм. Тез. докл. 4 Всесоюзного симпозиума по медицинской энзимологии. Алма-Ата, 1983. С. 234-235.

4. Знаменская Л.В., Шарипова М.Р., Ромахина Е.Р., Филатова С.В., Балабан Н.П. Регуляция биосинтеза фосфогидролаз у бацилл. Тез. докл. 7 съезда Всерос. микробиол. общества. Алма-Ата, 1985. Т.2. С. 59.

5. Волкова Т.И., Лопатнев С.В., Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Голубенко И.А., Лещинская И.Б. Биотехнология получения бактериальной рибонуклеазы. Тез. докл. Всесоюз. конф. "Нуклеазы микроорганизмов и их практическое использование". Рига, 1985. С. 59-60.

6. Лещинская И.Б., Балабан Н.П., Знаменская Л.В., Шарипова М.Р., Филатова С.В., Чернокальская Е.Б., Ромахина Е.Р. Изучение спорообразующих аэробных бактерий как объектов генной инженерии. Тез. докл. 5 Всесоюз. биохим. съезда. Киев, 1986. С. 123-125.

7. Шарипова М.Р., Лещинская И.Б., Феоктистова Н.В. Секретция РНКазы *Bacillus intermedius*. Тез. докл. Всесоюз. конф. Регуляция микробного метаболизма. Пущино, 1989. С. 74-75.

8. **Шарипова М.Р.**, Волкова Т.И., Балабан Н.П., Лопатнев С.В. Внутриклеточный ингибитор секретируемой РНКазы *Bacillus intermedius*. Тез. докл. межреспубл. совещания "Нуклеазы микроорганизмов и их практическое использование". Рига, 1989. С. 37.

9. **Шарипова М.Р.**, Балабан Н.П., Вершинина В.И., Волкова Т.И., Лопатнев С.В., Лещинская И.Б. Получение бациллярных РНКаз и их внутриклеточных ингибиторов. Тез. докл. Всесоюзн. конфер. "Методы получения, анализа и применения ферментов". Юрмала, 1990. С. 56.

10. Балабан Н.П., **Шарипова М.Р.**, Вершинина В.И., Волкова Т.И., Лещинская И.Б. Получение и характеристика модифицированной *in vivo* бациллярной РНКазы. Тез. докл. Всесоюзн. конфер. "Методы получения, анализа и применения ферментов". Юрмала, 1990. С. 55.

11. **Шарипова М.Р.** Бациллярные экзорибонуклеазы и их внутриклеточные ингибиторы. Тез. докл. Всесоюзн. конфер. "Современные методы выделения, очистки и идентификации микробных метаболитов". Пушкино, 1991.

12. Балабан Н.П., **Шарипова М.Р.**, Усманова А.М., Ицкович Е.Л., Лещинская И.Б. Выделение, очистка и некоторые свойства протеиназы *Bacillus intermedius*. Тез. докл. III симпозиума "Химия протеолитических ферментов". Москва, 1993. С. 64.

13. **Шарипова М.Р.**, Балабан Н.П., Нехотяева Н.В., Ицкович Е.Л. Секреция щелочной фосфатазы и протеазы антибиотикоустойчивыми штаммами *Bacillus intermedius*. Тез. докл. конф. "Биосинтез ферментов микроорганизмами". Москва, 1993. С. 115.

14. **Sharipova M.R.**, Rockstroh A., Filimonova M.N., Leshchinskaya I.B. Bacterial nucleases as antiviral agents. Sixth European Congress on Biotechnology. Firenze, Italy, 1993.

15. Znamenskaya L.V., Chernokalskaya E.B., Gabdrakhmanova L.A., **Sharipova M.R.**, Leshchinskaya I.B. Regulation of the binase gene expression by exogenous factors. 3th International Meeting on ribonucleases: chemistry, biology, biotechnology. Capry, Italy, 1993. P. 40.

16. Ризванов А.А., Шакиров Е.В., Лопухов Л.В., **Шарипова М.Р.** Гидрофобное ядро белков и взаимосвязь их первичной и третичной структур. Тез. докл. VI конф. РФ "Новые направления биотехнологии". Пушкино, 1994. С. 89.

17. **Sharipova M.R.**, Balaban N.P., Itskovich E.L., Leshchinskaya I.B. Production and application of extracellular hydrolases from Bacilli. II Congress on Biotechnology (UK). Brighton, 1994. P. 31-33.

18. Lopukhov L.V., Rizvanov A.A., Shakirov E.V., **Sharipova M.R.**, Leshchinskaya I.B. Computer analysis of hydrophobic core and correlation between primary and three dimensional structure of proteins. 16th International congress of biochemistry and molecular biology. New Delhi, India, 1994. P7-375.

19. **Sharipova M.R.**, Balaban N.P., Itskovich E.L., Rudenskaya G.N., Leshchinskaya I.B. Secretory enzymes from *Bacillus intermedius*. 16th International congress of biochemistry and molecular biology. New Delhi, India, 1994. P7-245.

20. **Sharipova M.R.**, Balaban N.P., Nekhotyaeva N.V., Leshchinskaya I.B. Secretory phosphatase from *Bacilli*. Proceeding 4th Pacific Rim Biotechnology conference. Melbourne, Australia, 1995. P. 320.

21. Lopukhov L.V., **Sharipova M.R.**, Rizvanov A.A. The role of hydrophobic residues (Trp) of *Bacillus intermedius* Rnase in secretion. Euroasian symposium on current trends in biotechnology. Ankara, Turkey, 1995.

22. Balaban N.P., **Sharipova M.R.**, Itskovich E.L., Mardanova A.M., Shakirov E.V., Leshchinskaya I.B. Serine proteinase from *Bacillus intermedius*. Conference "Beijerinck Centennial". Netherlands, 1995.

23. **Sharipova M.R.**, Balaban N.P., Itskovich E.L., Rudenskaya G.N. Secretory proteinase from *Bacillus intermedius*. 7th European Congress on Biotechnology. Nice, France, 1995. V.1. P. 52.

24. Shakirov E.V., Balaban N.P., **Sharipova M.R.**, Gabdrakhmanova L.A., Leshchinskaya I.B., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. Characterization of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius*. VII Meeting on industrial applications of enzymes. Barcelona, Spain, 1997. P. 170.

25. **Sharipova M.R.**, Balaban N.P., Nekhotyaeva N.V., Vershinina O.A. Mardanova A.M. Alkaline phosphatase from *Bacilli*. 8th European Congress on Biotechnology. Budapest, Hungary, 1997. P. 388.

26. **Sharipova M.R.**, Balaban N.P., Rudenskaya G.N., Leshchinskaya I.B. Expression and secretion of hydrolases in *Bacillus intermedius*. Ninth European Congress on Biotechnology. Brussels, Belgium, 1999.

27. Gabdrakhmanova L.A., Shakirov E.V., Balaban N.P., **Sharipova M.R.**, Rudenskaya G.N., Leshchinskaya I.B. The medium for the synthesis of glutamylendopeptidase from *Bacillus intermedius* and its localization in the cells. Ninth European Congress on Biotechnology. Brussels, Belgium, 1999.

28. **Sharipova M.R.**, Balaban N.P., Gabdrakhmanova L.A., Lopukhov L.V., Leshchinskaya I.B. Secretion of alkaline ribonuclease from *Bacillus intermedius* cells. 5th International meeting on ribonucleases. Virginia, USA, 1999.

29. Shakirov E.V., Gabdrakhmanova L.A., Balaban N.P., **Sharipova M.R.**, Leshchinskaya I.B., Rudenskaya G.N. Effects of culture components on the biosynthesis of glutamylendopeptidase *Bacillus intermedius*. The Protein Society Thirteenth Symposium. Boston, Massachusetts, 1999.

30. **Sharipova M.R.**, Shakirov E.V., Balaban N.P., Gabdrakhmanova L.A., Rudenskaya G.N., Leshchinskaya I.B. Localization of glutamylendopeptidase and thiol-dependent serine proteinase in *Bacillus intermedius* cells. The Protein Society Thirteenth Symposium. Boston, Massachusetts, 1999.

31. **Sharipova M.R.**, Balaban N.P., Garusov A.V., Shakirov E.V., Leshchinskaya I.B. Secretion of alkaline phosphatase from *Bacillus intermedius* cells. The Protein Society Thirteenth Symposium. Boston, Massachusetts, 1999.

Патенты

1. Клейнер Г.И., Волкова Т.И., Балабан Н.П., Голубенко И.А., Шарипова М.Р., Дудкин С.М., Лещинская И.Б. Способ получения внеклеточной щелочной рибонуклеазы *Bacillus intermedius*. Патент СССР №1314670 (1985).

2. Kluge S., Rockstroh A., Stenz E., Leschinskaja I.B., Scharipova M.R., Atabekov I.G., Taljanski M.E., Kaplan I.B., Katkov V.S., Karpejski M.Ja. Biogene mittel zur chemotherapie pflanzlicher virosen. Deutsches Patentamt DD A 01 N/340 707 1 (1991).

3. Stenz E., Rockstroh A., Kluge S., Leschinskaja I.B., Scharipova M.R., Filimonova M.N. Mittel gegen RNA-bakteriophagen in mikrobiellen produktionsprozessen. Deutsches Patentamt DD A 01 N/340 706 2 (1991).

Автор выражает признательность и глубокую благодарность профессору Инне Борисовне Лещинской и профессору Галине Николаевне Руденской за постоянное внимание к работе, а также всем коллегам и коллективам, с которыми автор работал.

Автор тепло благодарит семью за поддержку и посвящает эту работу светлой памяти своего отца, Шарипова Рашида Гарифовича.

Шарипова

2-00

Подписано в печать 27.10.2000. Формат 60/84/16.
Усл. печ. л. 3,25. Договор № 28. Тираж 100.

Лаборатория оперативной печати ТГГИ.
420036, г. Казань, ул. Побежимова 47а, тел. 544373